

Immunhistochemische Untersuchung
auf BILIÄRES GLYCOPROTEIN
in fetalen Organen sowie normalen
und neoplastisch veränderten Geweben
des Erwachsenen

Christian Reischle

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0045

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. M. Eder

**Immunhistochemische Untersuchung auf
BILIÄRES GLYCOPROTEIN
in fetalen Organen sowie normalen
und neoplastisch veränderten Geweben
des Erwachsenen.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Reischle

aus

München

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. B. Wiebecke

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. M. Eder

Prof. Dr. W. Neupert

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

21.04.88

**MEINER WUNDERBAREN UND UNVERGESSENEN
OMI IN GEDENKEN
UND MEINEN LIEBEN ELTERN
GEWIDMET**

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung

1. Einleitung und Problemstellung für die vorliegende Arbeit
2. Charakterisierung und Bedeutung der in dieser Studie verwendeten Antigene
 - 2.1 BGP-I (Biliäres Glycoprotein)
 - 2.2 CEA (Carcinoembryonales Antigen)
 - 2.3 NCA (Nonspecific Crossreacting Antigen)
 - 2.4 AFP (Alpha Fetoprotein)
 - 2.5 N-PP-III (Aminoterminales Prokollagen III)
 - 2.6 CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia-associated Antigen)
 - 2.7 CA-19-9 (Carboanhydrate Antigen 19-9)
3. Grundprinzipien der Indirekten-Immunperoxidase-Technik (IOP)

II. Material und Methoden, (S. 21ff)

1. Material

- 1.1 Lösungen und Substanzen
- 1.2 Unspezifische Antiseren (mit den entsprechenden Verdünnungen)
- 1.3 Spezifische Antiseren (mit den entsprechenden Verdünnungen)
 - (1.3.1/2/4) Übersicht der geforderten Gewebsspezifität von A-BGP-I, A-CEA und A-NCA
 - 1.3.1 A-BGP-I (Anti-BGP-I, polyklonal)
 - 1.3.2 A-CEA (polyklonal)
 - 1.3.3 Monoklonales Anti-CEA Serum
 - 1.3.4 A-NCA (polyklonal)
 - 1.3.5 Monoklonales Anti-NCA Serum
 - 1.3.6 A-AFP (polyklonal)
 - 1.3.7 A-N-PP-III (polyklonal)
 - 1.3.8 A-CALLA (monoklonal)
 - 1.3.9 A-CA-19-9 (monoklonal)
- 1.4 Proben für die spezifischen Antiseren
- 1.5 Proben für die Peroxidasen

2. Methoden

- 2.1 Vorbereitung zur praktischen Durchführung der Versuche
- 2.2 Nachabsorption von A-BGP-I
- 2.3 Durchführung der Indirekten-Immunperoxidase-Technik (IOP)
 - (2.3.1) PBS - (Phosphate Buffered Saline) Kontrollen (S. 37)
 - (2.3.2) Bewertung der immunhistochemischen Färbeargebnisse (S. 38)

III. Ergebnisse (mit immunhistologischen Abbildungen, S. 39ff)

1. Tabellarische Aufstellung aller immunhistochemisch untersuchten Gewebe, Tab. 4
2. Zusammenfassung der unterschiedlichen Lokalisation von BGP-I, CEA, NCA, AFP, N-PP-III, CALLA und CA-19-9 in menschlichen Geweben, Tab. 5
3. Übersicht der immunhistologischen Abbildungen, Tab. 6

IV. Diskussion, S. 89ff

1. Methodik
2. Ergebnisse
 - 2.1 BGP-I-Antiserum
 - 2.2 BGP-I-Leberspezifität
 - 2.3 BGP-I und seine wichtigsten kreuzreagierenden Antigene, CEA und NCA
 - 2.4 Abhängigkeit der BGP-I-Expression von der Zelldifferenzierung
 - 2.5 BGP-I bei Cholestase
 - 2.6 Intrakanalikuläres Auftreten von CALLA
 - 2.7 N-PP-III
 - 2.8 AFP / CA-19-9

V. Schlußfolgerungen, S. 96

VI. Zusammenfassung, S. 97ff

VII. Literaturverzeichnis, S. 99ff

I. EINLEITUNG

1. Einleitung und Problemstellung für die vorliegende Arbeit

Bisher wurde BGP-I nur immunfluoreszenzmikroskopisch (Svenberg et al. 1976/79a,b) in der Leber des gesunden Erwachsenen nachgewiesen und als leberspezifisch bezeichnet.

Ein Vorkommen im gesunden Colon des Erwachsenen entsprach möglicherweise lediglich einem Anlagerungseffekt, da dieses Antigen mit der Blasengalle über den Darm ausgeschieden wird. Dies konnte aus methodischen Gründen nicht sicher beurteilt werden, da die Immunfluoreszenzmikroskopie im Gegensatz zur immunhistologischen Untersuchungstechnik keine Aussage über die tatsächliche Lokalisation von Antigenen - intra- oder extrazellulär - erlaubt.

Aus diesem Grund sollte es das Ziel dieser Arbeit sein, erstmals eine immunhistochemische Untersuchung der oben genannten sowie anderer Gewebe des Erwachsenen und des Foeten auf die genaue Lokalisation von BGP-I durchzuführen.

Im Klinikum Großhadern wurden im Rahmen einer klinisch orientierten BGP-I Studie (Stieber 1986) erhöhte Serumspiegel bei Patienten mit cholestatischen und entzündlichen Lebererkrankungen und auch bei Tumorpunkten mit Lebermetastasen der verschiedensten Primärtumore, wie z.B. eines colorektalen Karzinoms, gefunden. Mit der vorliegenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob eine Übereinstimmung zwischen diesen klinischen und immunhistochemischen Befunden besteht, und in welcher histologischen Beziehung das BGP-I zu den verschiedenen Primärtumoren der Lebermetastasen stehen würde. Vielleicht ließe sich aus den daraus gewonnenen Erkenntnissen ein neuer Marker für bestimmte Lebererkrankungen oder ein brauchbarer Cholestaseparameter ableiten.

Zu diesem Zweck sollten nun neben normalen fetalen und adulten, die verschiedensten entzündlich und maligne veränderten Gewebe des Erwachsenen auf BGP-I untersucht, und der Einfluß obstruktiver, entzündlicher, sowie maligner Prozesse auf den BGP-I-Gehalt der Leber geprüft werden.

Dabei sollten CEA und NCA, die wichtigsten mit BGP-I kreuzreagierenden Antigene, für eine mögliche histotopographische Abgrenzung jeweils mitlaufen.

Es sollte auch Ziel dieser Arbeit sein, die bekannte Abhängigkeit (Schüppel 1985) von CEA und NCA in ihrem histologischen Verteilungsmuster von der Art und dem Differenzierungsgrad der verschiedenen Tumore im Vergleich zu BGP-I zu untersuchen.

Zusätzlich sollte das BGP-I dann noch mit einer Reihe von anderen, bei bestimmten Fragestellungen interessierenden Antigenen verglichen werden, um zu sehen, ob sich ein Zusammenhang zwischen den teilweise signifikant und auffallend konstant erhöhten Serumwerten (Stieber 1986) von AFP und N-PP-III bei cholestatischen und entzündlichen Lebererkrankungen, von AFP, N-PP-III und CA-19-9 bei primären Leberkarzinomen sowie von BGP-I bei den oben genannten pathologischen Leberveränderungen und der jeweiligen immunhistologischen Ausprägung von BGP-I herstellen lassen könnte (zu AFP: Alpert et al. 1971a,b, Lehmann et al. 1974, Übersicht bei Lamerz et al. 1975 b, zu N-PP-III: Rohde et al. 1979, Hatahara et al. 1984, Colombo et al. 1985, zu CA-19-9: Klapdor et al. 1984-85, Staab et al. 1985).

Da nun für das CALLA der Firma Becton und Dickinson ein intrakanalikuläres Vorkommen wie für BGP-I beschrieben worden ist (Grogan et al. 1985), sollte auch dies im direkten immunhistochemischen Vergleich untersucht werden.

2. Charakterisierung und Bedeutung der in dieser Studie verwendeten Antigene:

- 2.1 Biläres Glycoprotein (BGP-I, Svenberg et al. 1976)
- 2.2 Carcinoembryonales Antigen (CEA, Gold und Freedmann 1965a,b)
- 2.3 Nonspecific Crossreacting Antigen (NCA, Mach - Pusztaszeri 1972, Kleist et al. 1972)
- 2.4 Alpha - Fetoprotein (AFP, Abelev et al. 1963, Tatarinov et al. 1964)
- 2.5 Aminoterminales Prokollagen III (N-PP-III, Taubmann et al. 1974/76, Nowack et al. 1976a,b)
- 2.6 Common Acute Lymphoblastic Leukemia-associated Antigen (CALLA, Graves et al. 1975)
- 2.7 Carboanhydrate Antigen (CA-19-9, Koprowski et al. 1979)



Zu 2.1. BGP-I (Biliäres Glycoprotein)

Im Jahre 1976 beschrieben Svenberg und Mitarbeiter mit dem Biliären Glycoprotein ein weiteres, neben dem NCA mit CEA kreuzreagierendes Antigen.

Hier von lassen sich aus menschlicher Galle nach Perchlorsäureextraktion (Verfahren ähnlich wie bei CEA und NCA) drei Subtypen isolieren, ein BGP-I, ein BGP-II und ein BGP-III (Svenberg et al. 1976, 1979a).

Im Gegensatz zu BGP-I, das in normaler Blasen- und Lebergalle vorkommt, erscheinen das BGP-II und BGP-III nur in der sogenannten weißen Galle (z.B. bei einem Verschuß des Ductus Cysticus).

Das BGP-I gehört, wie auch das CEA und NCA, zu den Glycoproteinantigenen und weist einen Kohlenhydratanteil von annähernd 40% auf. Elektrophoretisch zeigt es Alpha-1-Motilität, während CEA und NCA mit den Beta-Globulinen wandern.

Auch in bezug auf das Molekulargewicht unterscheidet sich das BGP-I (mit ca. 90.000 Dalton) ganz klar von CEA (mit ca. 180.000 Dalton) und NCA (mit ca. 120.000 Dalton). Sowohl beim BGP-I als auch dem CEA läßt sich im Gegensatz zu NCA kein Methionin im Molekül nachweisen (Svenberg et al. 1979a,b, Hammarström et al. 1977-78, Burtin 1978).

Wichtig ist auch die Tatsache, daß von diesen drei kreuzreagierenden Antigenen (BGP-I, CEA und NCA) lediglich das BGP-I in hohen Konzentrationen in normaler Blasen- und Lebergalle vorkommt.

Für das immunologische Reaktionsverhalten von BGP-I ist das Auftreten von identischen Epitopen (Antigendeterminanten) bei CEA und NCA von großer Bedeutung (siehe dazu Schema 1), da es bei der Verwendung von polyklonalen Antiseren gegen eines dieser Epitope zu nicht berechenbaren Kreuzreaktionen und folglich immunhistologischen Fehlinterpretationen kommen kann.

Antigen	Antigendeterminanten									
BGP-I	a	b	3	4	e	f	g	8	i	j
CEA abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NCA	I	2	III	4	V	VI	VII	8	IX	X

Schema 1: (Modifiziert nach Nap et al. 1986)

Dargestellt sind hier 10 hypothetische Epitope von CEA-abs (absorbiert) mit seinen wichtigsten kreuz-reagierenden Antigenen, dem BGP-I und dem NCA, mit deren Hilfe sich schematisch das Phänomen der gegenseitigen Kreuzreaktion erklären läßt.

Die gemeinsamen Antigendeterminanten wurden mit monoklonalen Anti-CEA Antikörpern aufgedeckt. Sobald sich nämlich dieser monoklonale Antikörper gegen ein gemeinsames Epitop richtete (z.B. zeigt CEA-3 Identität mit BGP-C), kam es zu einer Kreuzreaktion der beiden Antigene, die auch durch Absorptionen nicht beseitigt werden konnte (Nap et al. 1986).

Eben wegen dieser Teilidentität in den Antigendeterminanten zeigt das BGP-I ein dem CEA und NCA ähnliches Verhalten in der Doppeldiffusionstechnik und läßt sich teilweise mit hochgereinigtem CEA und NCA ausfällen (Svenberg et al. 1979 a/c, Burtin et al. 1986).

Aus demselben Grund ließ sich auch eine größere Fraktion von polyklonalen BGP-I Antikörpern an hochgereinigtes immunabsorbiertes CEA binden. Hierbei handelte es sich um ein CEA, das auch in der Immundiffusionstechnik ein ähnliches Ergebnis wie das BGP-I erbrachte (Ahrends et al. 1985, Stieber 1986).

Bisher ist das BGP-I (Svenberg et al. 1979 a/b, 1981) in der Leber und hier in Strukturen, die den intrahepatischen Gallenkapillaren und abführenden Gallenwegen zugeordnet wurden, immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen worden.

Ein Vorkommen im gesunden Colon des Erwachsenen erschien aus methodischen Gründen zweifelhaft, da dieses Antigen über die Galle in den Darm ausgeschieden wird, und dies zu einem bloßen Anlagerungseffekt geführt haben konnte. Sowohl der Synthesort als auch Abbau- und weitere Ausscheidungsmodalitäten sind für das BGP-I bis zum heutigen Stand der Forschung unbekannt.

Zu 2.2. CEA (Carcinoembryonales Antigen)

Auch das Carcinoembryonale Antigen (Gold und Freedmann 1965 a/b) gehört auf Grund seiner biochemischen Eigenschaften zur Familie der Glycoproteinantigene, wie das BGP-I und das NCA (Non-specific Crossreacting Antigen, Kleist et al. 1972, Mach et al. 1972, Burtin et al. 1973a,b).

Das Molekulargewicht beträgt etwa 180.000 Dalton, elektrophoretisch wandert es wie das NCA in der Beta-Globulinfraktion. Der CEA-Kohlenhydratanteil liegt bei 40 bis 60% und einem jeweils entsprechend reduzierten Proteinanteil, der dem Molekül eine große Variabilität verleiht (Krupey et al. 1967, Mach et al. 1972, Tuberville et al. 1973a,b, Neville et al. 1974, Hammarström et al. 1976/77/78, Burtin et al. 1978, Kessler et al. 1978, Rogers et al. 1981, Ahrends et al. 1985, Fletcher et al. 1986).

Der biochemischen Heterogenität von CEA, die ihre Ursache eben in einem stark variablen Kohlenhydrat- und damit Proteinanteil hat, steht eine relativ breite immunologische Identität der spezifischen immunodominanten Antigenepitope gegenüber, so daß in bezug auf das immunologische Verhalten der einzelnen CEA- Subtypen kein Unterschied festgestellt werden kann (Kleist et al. 1972, Lamerz et al. 1975 a, Rogers et al. 1981). Durch monoklonale Antikörperuntersuchungen (Kessler et al. 1978, Rogers et al. 1981, Primus et al. 1983 a/b, Grunert et al. 1985, Haggarty et al. 1986) konnten bisher sechs verschiedene Epitope (Antigendeterminanten) für das CEA gefunden werden, von denen einige auf mit CEA kreuzreagierenden Glycoproteinantigenen (BGP-I und NCA) vorkommen (Mach et al. 1972, Nap et al. 1986, siehe auch Schema 1, S. 5).

Diese Tatsache muß besonders beachtet werden, um etwaige immuno- bzw. histologische Fehlinterpretationen zu vermeiden.

CEA wird im Golgiapparat von Zellen der normalen als auch karzinomatös entarteten Dickdarmmucosa synthetisiert (Goldenberg et al. 1972, Huitric et al. 1976, Ahrends et al. 1985), die Metabolisierung erfolgt in der Leber, ausgeschieden wird es schließlich über die Galle (Thomas et al. 1983).

Ursprünglich wurde das CEA von Gold und Freedmann (1965a,b) als ein organ- bzw. tumorspezifisches Glycoproteinantigen beschrieben, das in Adenokarzinomen des Colon und Rektum vorkommt.

Bis heute gelang darüber hinaus sein Nachweis in den verschiedensten fetalen, entzündlich veränderten und einer Vielzahl maligne entarteter Gewebe.

In der Embryonal- bzw. Fetalzeit findet sich das CEA im Serum an Plasmaproteine gebunden sowie als Antigen-Determinant im Epithel vor allem in den Organen des Gastrointestinaltraktes zunehmend ab der 8. bis 16. Schwangerschaftswoche (SSW). So etwa im Darm, wobei hier zuerst das Rectum (in der 8. bis 16. SSW) und in der Folge aufsteigend der gesamte Darm bis etwa zur 16. bis 27. SSW CEA-positiv wird (Khoo et al. 1973 a/b, Dyce et al. 1974, Goldenberg et al. 1978, Wagener et al. 1978/ 83, Gadler et al. 1980, Nap et al. 1986). Beim Erwachsenen ist vor allem die Dickdarmmucosa CEA-haltig.

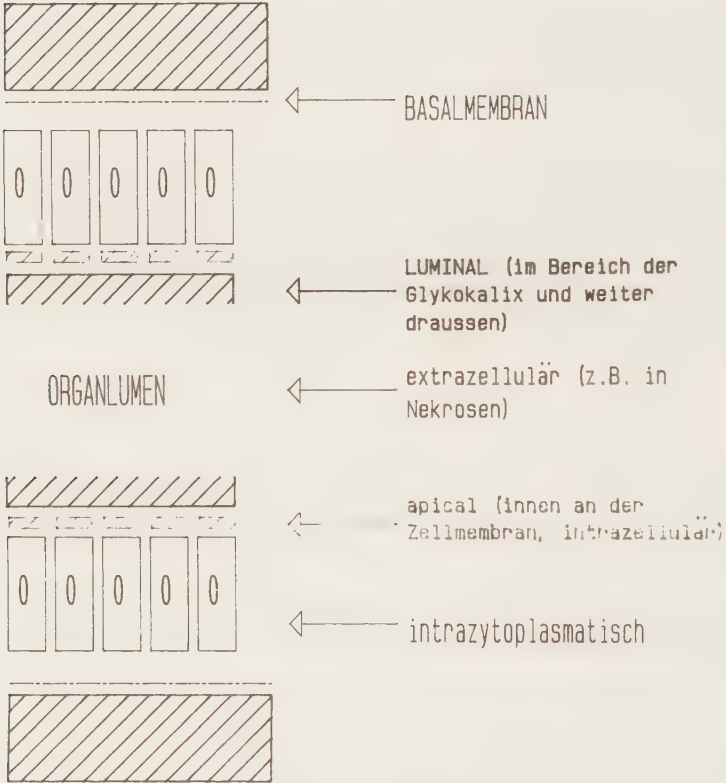
Grundsätzlich existieren für das Carcinoembryonale Antigen - z.B. in der Dickdarmmucosa - mehrere histologische Verteilungstypen (siehe dazu auch das nachfolgende Schema 2):

Dazu gehören:

- eine intrazytoplasmatisch,
- eine apical (Schüppel 1985),
- eine luminal und
- eine extrazellulär

beispielsweise in Nekrosen gelegene Verteilung (Gold et al. 1968/70, Krupey et al. 1968, Kleist et al. 1972, Burtin et al. 1972 a/b, 1974/77 b, Darcy et al. 1973, Huitric et al. 1973, Rogalsky et al. 1975, Primus et al. 1975/81, Goldenberg et al. 1978, Wagener et al. 1981 a/b, Ahnen et al. 1982, Ahrends et al. 1985, Fletcher et al. 1986).

Schema 2:



Bei malignen Prozessen kommt es dann noch zu einer variablen Ausprägung der verschiedenen histologischen Verteilungsmöglichkeiten. So tritt bei Adenomen und Karzinomen mit zunehmender Entdifferenzierung die apicale und luminale Verteilung von CEA immer mehr zurück, während dagegen die zytoplasmatische Anfärbbarkeit zunimmt (Schüppel 1985).

Auch in einer Vielzahl normaler (Galle, Darmsekret, Stuhl, Mekonium, Urin und im Serum) sowie pathologisch veränderter Körperflüssigkeiten und Sekreten kann das CEA nachgewiesen werden (Khoo et al. 1973 a, Neville et al. 1974/81, Lurie et al. 1975, Kleist von et al. 1977, Primus et al. 1978, Wagener et al. 1978/81 b, Kuroki et al. 1981).

Bekanntermaßen finden sich unter den Malignomen, vor allem bei den Karzinomen und hier besonders dem colorektalen Karzinom, deutlich erhöhte CEA-Serumspiegel.

Aber auch bei den benignen Erkrankungen, überwiegend des Darmes, wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, bei Hepatitis, akuter und chronischer Pankreatitis, Lungenemphysem, Bronchitis und sogar bei starken Rauchern, lassen sich erhöhte CEA-Serumwerte nachweisen, die jedoch im Vergleich zu malignen Erkrankungen nur geringfügig und dann intermittierend erhöht sind (Kleist von et al. 1969/79/80, Kuo et al. 1973, Neville et al. 1974, Zamcheck et al. 1975, MacNap et al. 1978, Wagener et al. 1978/81 b, Heald et al. 1979, Burtin et al. 1979, Van Nagell et al. 1980, Melia et al. 1981, Shevchuk et al. 1981, Björnkund et al. 1982, Kuhajda et al. 1983, Fleuren et al. 1983, Sandler et al. 1984, Tsutsumi et al. 1984, Brümmerdorf et al. 1985, Hamada et al. 1985, Koelma et al. 1986, Nap et al. 1986, Übersicht bei Lamerz et al. 1975 a/77).

Das CEA unterliegt auch physiologischerweise geringfügigen Schwankungen in Abhängigkeit vom Alter, wobei die CEA-Serumspiegel mit steigendem Lebensalter etwas höher (aber im Normbereich) als bei jüngeren Individuen liegen (Lamerz et al. 1975 a).

Heute gehört das CEA zur kleinen Gruppe der klinisch relevanten Tumormarker mit Bedeutung als Verlaufs- und Nachsorgeparameter (Staab et al. 1985, Loprinzi et al. 1986, Fletcher et al. 1986, Röttinger et al. 1986).

Zu 2.3. NCA (Nonspecific Crossreacting Antigen)

Das NCA (Kleist et al. 1972, Mach-Pusztaszeri 1972) ist das wichtigste mit CEA kreuzreagierende Antigen (Hammarström et al. 1977/78, Burtin et al. 1978). Dabei handelt es sich nicht um ein einzelnes, sondern eine Gruppe von Antigenen wie z.B.

- BCGP = Breast Cancer Glycoprotein, Kuo et al. 1973,
- NCA II = Normal Fecal Antigen, Burtin et al. 1973 a,b/77a,b,
- CCEA II = Colonic Carcinoembryonic Antigen II, Newman et al. 1972

und viele andere, die auf Grund ihrer sehr ähnlichen biochemischen und physikalischen Eigenschaften, sowie ihres fast gleichen immunologischen Verhaltens zur Gruppe der "Nonspecific Cross-reacting Antigene" zusammengefaßt werden (Lamerz et al. 1975 a, Kleist et al. 1977, Svenberg et al. 1979 a).

Das NCA wird, wie das CEA und BGP-I, durch das Verfahren der Perchlorsäureextraktion gewonnen. Sein Molekulargewicht beträgt um 120.000 Dalton, elektrophoretisch wandert es, wie das CEA, in der Beta-Globulin-Fraktion (Kleist et al. 1972, Mach et al. 1972, Grunert et al. 1985), sein Kohlenhydratanteil variiert zwischen 25 und 35%. Auch das NCA besitzt mit dem CEA und BGP-I gemeinsame Antigenepitope (siehe dazu auch Schema 1 und Kleist et al. 1972, Hammarström et al. 1977/78, Burtin et al. 1978/86, Nap et al. 1986), wodurch sich die gegenseitige Kreuzreaktion erklären läßt.

Auffällig ist, daß das NCA im Gegensatz zu CEA und BGP-I, die Aminosäure Methionin enthält (Hammarström et al. 1976) und eine humorale Immunantwort hervorzurufen vermag (Kleist et al. 1972). Aus diesem Grunde lassen sich bei manchen Patienten gegen NCA gerichtete Antikörper nachweisen (Kleist et al. 1972).

Neben Pankreas und Colon sind die Alveolarmakrophagen und das Alveolarepithel NCA-haltig (Mach et al. 1972, Burtin et al. 1975/ 80/86, Gadler et al. 1980).

Die rote Blutzellreihe enthält, im Gegensatz zur granulopoetischen Reihe, und diese besonders ab den Myelozyten sowie den Granulozyten und Monozyten, kein NCA (Burtin et al. 1982a,b). Thrombozyten und Lymphozyten sind frei von NCA (Darcy et al. 1973, Burtin et al. 1974/80/86, Wahren et al. 1982a,b).

Zusätzlich wurde das NCA in verschiedenen Körpersekreten (Urin, Feaces und Serum bzw. Plasma), der weiblichen Brustdrüse und der Prostata nachgewiesen (Burtin et al. 1972c,d/ 73b/77b, Darcy et al. 1973, Kleist von et al. 1977, Gadler et al. 1980, Kuroki et al. 1981, Nap et al. 1984a,b).

Unter den Malignomen sind das Colon-, Mamma-, Bronchial-, Blasen- und medulläre Schilddrüsenkarzinom (alle genannten sehr inkonstant), NCA-positiv (Darcy et al. 1973, Burtin et al. 1973 b/74/86, Nap et al. 1984b). Während das NCA in den Zellen der normalen Dickdarmmucosa (inkonstant) schwach luminal-apikal und stärker zytoplasmatisch verteilt erscheint, taucht es bei Malignomen der selben (ebenfalls inkonstant), bei zunehmender Entdifferenzierung verstärkt intrazytoplasmatisch, bei gleichzeitigem Rückgang der luminal bis apikal gelegenen Anordnung auf (Schüppel 1985). Die Züge eines Differenzierungsantigens sind vergleichsweise beim NCA aber wesentlich geringer und inkonstanter ausgeprägt als beim CEA (Burtin et al. 1973 a,b).

Wegen der fehlenden Tumor- bzw. Organspezifität wäre ein klinischer Einsatz von NCA als Verlaufs- und Nachsorgeparameter lediglich bei der chronischen myeloischen Leukämie sinnvoll (Wahren et al. 1982a,b).

Zu 2.4. AFP (Alpha Fetoprotein)

Auch das AFP gehört mit einem Kohlenhydratanteil von 4% wie die vorgenannten Antigene biochemisch zu den Glycoproteinen, weist ein Molekulargewicht von etwa 70.000 Dalton auf, zeigt mit dem BGP-I Alpha-1-Motilität in der Elektrophorese und wird wie das CEA zur Gruppe der sog. karzinofoetalen Antigene (Alpert et al. 1971a,b, Alexander et al. 1972, Uriel et al. 1970/74, Nap et al. 1986) gerechnet (Übersicht bei Lamerz et al. 1975 b).

Das AFP erscheint während der Fetal- und Embryonalperiode ab der 4. Schwangerschaftswoche mit einem Gipfel in der 13. bis 15. SSW, während es post partum und bei einem gesunden Erwachsenen nur noch in äußerst geringen Konzentrationen nachweisbar ist (Ruoslahti et al. 1971 a, b).

Mit Hilfe der Elektrophorese konnte beim AFP zusätzlich eine schnelle und eine langsame Fraktion nachgewiesen werden, deren Vorkommen genetischen Varianten zugeschrieben wurde (Ganrot et al. 1970, Portugal et al. 1970). Das AFP weist auf Grund seiner physikalischen und biochemischen Eigenschaften große Ähnlichkeiten mit Albumin auf, dessen Funktion es während der Fetalperiode, nämlich Bindung der mütterlichen Östrogene und somit Schutz davor, übernimmt, da die Albuminsynthese erst langsam in Gang kommt (Gitlin et al. 1972).

In der Embryonalperiode wird das AFP im Dottersack und der Leber gebildet (Gitlin et al. 1972). Diagnostisch wichtig ist hier ein erhöhtes Vorkommen im Fruchtwasser bei Mißbildungen wie Neuralrohrdefekten, Spina bifida occulta, Anenzephalus, Down Syndrom und fetalem Tod in Utero (Masopust et al. 1968, Tsuchida et al. 1973, Seppelae et al. 1973 a,b, Wald et al. 1974, Talermann et al. 1977, Koelma et al. 1986). In der fetalen Leber findet sich das AFP in den Leberzellen diffus intrazytoplasmatisch besonders in einem Bereich um die Zentralvenen gelegen (Ganrot et al. 1970, Putilo et al. 1971a,b, Engelhardt et al. 1971, Goussev et al. 1971, Adinolfi et al. 1971, Abelev et al. 1971/73, Thung et al. 1979, Kojiro et al. 1981, Koelma et al. 1986).

Zusätzlich gelang sein Nachweis in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie z.B. im Serum von Schwangeren, Galle, Stuhl und Urin (O'Connor et al. 1970, Gitlin et al. 1972).

Bei der reparativen Leberzellregeneration zeigt sich nur eine geringe Anzahl von AFP positiven Zellen, ebenfalls mit diffus zytoplasmatischer Verteilung, meist um die Zentralvenen gelegen (Abelev et al. 1971, Goussev et al. 1971, Nishioka et al. 1972).

AFP Spiegel-Erhöhungen finden sich offenbar in Folge gesteigerter Leberzellregeneration bei mehreren benignen Lebererkrankungen, wie z.B. der Hepatitis A und B, bei der Hämochromatose und der primär biliären Zirrhose, welche mit disseminierten Leberzelluntergängen verbunden sind, sowie beim kontrazeptiva-induzierten Hepatom (Adinolfi et al. 1971, Silver et al. 1974, Smith et al. 1974, Hooge et al. 1974). Hohe AFP- Serumwerte werden beim primären hepatozellulären Leberkarzinom möglicherweise durch die Persistenz von Hepatoblasten bedingt, und auch bei Lebermetastasen der verschiedensten Primärtumore, ebenfalls als Ausdruck eines gesteigerten Leberzellumsatzes gefunden (Abelev et al. 1967/73, Uriel et al. 1969/70, Pierce et al. 1970, Smith et al. 1971a,b, Alexander et al. 1972).

Auffallend konstant erhöhte Serumspiegel finden sich auch bei den Teratomen von Hoden und Ovar, die durch eine Synthese Dottersack-Entoderm-ähnlicher Zellen hervorgerufen sein könnten (Abelev et al. 1973, Tsuchida et al. 1973).

Zu den wesentlichen Indikationen einer AFP Spiegelbestimmung zählen heute der Verdacht auf maligne Keimdrüsentumoren, das primäre Leberzellkarzinom und intrauterine Mißbildungen (Lehmann et al. 1973a,b/74, Thung et al. 1979, Koelma et al. 1986, Röttinger et al. 1986).

Zu 2.5. N-PP-III (Aminoterminales Prokollagen III)

Das Kollagen, ein Glycolipid in der Form einer Tripelhelix als Sekundärstruktur, stellt als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix das wichtigste Protein des Bindegewebes dar (Hahn et al. 1980 a, b).

Das Prokollagen III (Popper et al. 1970, Taubmann et al. 1974/ 76, Nowack et al. 1976a,b, Vargas et al. 1978, Rojkind et al 1979 b, Hahn et al. 1980 a, b, Gay et al. 1985) gehört als Vorstufe von Kollagen III zu einer Familie von zehn Kollagentypen, die sich sowohl hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften und Erscheinungsformen, als auch in ihrer speziellen Lokalisation unterscheiden (siehe Tabelle 1, modifiziert nach Hahn et al. 1980 b, Konomi et al. 1981, und Gay et al. 1985). Der Biosynthesemodus von N-PP-III wie auch der anderen Kollagene ist in den jeweiligen Geweben sehr ähnlich (Fessler et al. 1978, Prockop et al. 1979, Hahn et al. 1980a,b,c). Auch das Prokollagen III ist in seiner Struktur nicht einheitlich, sondern gliedert sich wiederum in drei Subtypen (Rohde et al. 1979/83 a, b), die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichtes (ein Typ mit 45.000 Dalton erscheint im Serum und Aszites, ein anderer mit 10.000 Dalton im Urin) und Antigeneigenschaften voneinander unterscheiden.

Das N-PP-III zirkuliert im Gegensatz zu Kollagen III, das sofort vernetzt wird, im Serum und besitzt am Ende eine zusätzliche Peptidgruppe, die später enzymatisch abgespalten wird. Dieses Peptid stellt in seiner freien Form das im Radioimmunassay zu bestimmende Substrat dar, anhand dessen man auf die Menge von Prokollagen III schließen kann. Das N-PP-III läßt sich schon früh in fetalen Geweben nachweisen und ist auch bei einem Neugeborenen noch in hohen Spiegeln vorhanden (bis 250 mg/ml), die dann konstant und stetig bis etwa zum 20. Lebensjahr auf den Wert eines gesunden Erwachsenen absinken (3 - 15 mg/ml, Hahn et al. 1980 b).

Als Bildungsorte konnten sowohl die Hautfibroblasten, die glatten Muskelzellen, Gefäßendothelien, als auch die perisinusoidalen Zellen der Leber identifiziert werden (Fessler et al. 1978). Das N-PP-III wird über die Galle ausgeschieden und gelangt in den enterohepatischen Kreislauf (Raedsch et al. 1983). In der gesunden Leber, die nur etwa zu einem Prozent ihres Naßgewichtes aus N-PP-III besteht, läßt sich das Prokollagen III im perisinusoidalen Raum in Form von dünnen retikulinfaserartigen Bündeln und im Periportalfeld nachweisen (siehe Abb. 8, Biempica et al. 1980, Hahn et al. 1980 b, Konomi et al. 1981).

Durch Prospektive Studien konnte gezeigt werden, daß eine enge Korrelation zwischen erhöhten N-PP-III Serumwerten und morphologisch nachweisbaren Leberveränderungen besteht (Gay et al. 1975, Vargas et al. 1978, Raedsch 1981/82, Nakano et al. 1983, Frei et al. 1984, Murata et al. 1984).

Wie bereits oben erwähnt, hat die gesunde Leber nur einen geringen Gehalt (etwa 1% ihres Naßgewichtes) an Prokollagen III. Kommt es nun infolge pathologischer Prozesse, z.B. einer disseminierten Nekrose von Hepatozyten, zu einer N-PP-III Vermehrung, steigt auch sein Serumwert entsprechend an, der nun einen unspezifischen Hinweis auf den Ersatz von funktionsfähigem Leberparenchym durch Bindegewebe zu geben vermag (Rojkind et al. 1976/79a, Raedsch et al. 1981/82, Nakano et al. 1983, Frei et al. 1984, Galambos et al. 1985).

Mittlere bis hohe Serumwerte (bis über 40 ng/ml) bei Erwachsenen werden beispielsweise bei der Hämochromatose mit Zirrhosebildung, sowie chronischen Hepatitiden, höchste Werte (bis weit über 100 ng/ml) bei akuten Hepatitiden, bei Leberzirrhosen (alkoholisch und primär biliär bedingt) und beim primären hepatozellulären Leberkarzinom gefunden (Rohde et al. 1979, Frei et al. 1984, Weigand et al. 1984, Morelli et al. 1985, Colombo et al. 1985, Torres-Salinas et al. 1986).

In der Praxis könnte eine mögliche Indikation zur Bestimmung von Prokollagen III bei der Verlaufskontrolle von Hepatitiden, die mit einer Bindegewebsvermehrung einhergehen, liegen.

KOLLAGEN TYP	VERTEILUNG IM GEWEBE	ERSCHEINUNGSFORM
I	Knochen, Sehnen, Bänder, Faszien Haut, Dentin, Arterien, Herz, Uterus	Fibrillen
II	Hyaliner Knorpel	Fibrillen
III + N-PP-III	Haut, Parenchyma- töse Organe, Ar- terien, Herz, Muskel, Uterus	Fibrillen
IV	Basalmembranen Dissesscher Raum	Dimere --> Tetra- mere --> Polymere
V	Muskel, perizellulär	Fibrillen
VI	Gefäße (Intima)	Ketten aus Fibrillen und Glycoprotein
VII, VIII, IX und X	weitere Kollagentypen	

Tabelle 1:

KOLLAGENTYPEN UND IHRE VORKOMMEN
Modifiziert nach Hahn et al. 1980-b,
Gay et al. 1985

Zu 2.6. CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia-associated Antigen)

CALLA (Graves et al. 1975) in der Form einer antigenen Determinante, wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit den Zellen eines Patienten, der an einer akuten lymphatischen Leukämie erkrankt war und dem daraus gewonnenen Antiserum (Anti- CALLA) nachgewiesen (Graves et al. 1975). Dieses Antiserum reagiert mit einem Glycoproteinantigen, mit einem Molekulargewicht von annähernd 100.000 Dalton (Ritz et al. 1980).

Heute existieren mehrere monoklonale Antisera, die in der Lage sind, die unterschiedlichen Epitope des CALLA zu erkennen (Graves et al. 1975, Ritz et al. 1980, Le Bien et al. 1982).

Bisher wurde das CALLA weder auf peripher zirkulierenden Blutzellen, noch in lymphatischen Geweben wie Lymphknoten, Milz oder Thymus, nachgewiesen (Nadler et al. 1981). Trotz dieser Tatsache und obwohl das CALLA auch nicht auf peripher zirkulierenden Lymphozyten gefunden wurde, kann es dennoch nicht als leukämiespezifisch bezeichnet werden, da es auch auf Desoxy-nucleotid-Transferase-positiven Knochenmarkszellen, die als Vorläufer der lymphatischen Blutzellreihe angesehen werden, nachgewiesen wurde (Graves et al. 1983, Foon et al. 1986).

Auffallend viele CALLA positive Zellen, 5 bis 10%, zeigten sich in der fetalen Leber, weniger dagegen (etwa 2%) in sich regenerierendem Knochenmark. Es wird vermutet, daß diese normalen CALLA-positiven Zellen ebenfalls frühen lymphatischen Knochenmarksstammzellen entsprechen (Clavell et al. 1981, Nadler et al. 1981). Auch eine Reihe von Zellen maligner Lymphome, wie des Burkitt-Lymphoms, der nicht T-Zell akuten lymphatischen Leukämie, von gering differenzierten B- und T-Zell-Lymphomen und einer chronischen myeloischen Leukämie im Blastenschub, sind in der Lage, das CALLA zu exprimieren (Ritz et al. 1980/81, Graves et al. 1981 a, b, Bettelheim et al. 1982, Braun et al. 1983, Cossmann et al. 1983, Anderson et al. 1984, Durie et al. 1985).

Daneben wurde dieses Antigen noch in malignen Melanomen, in der Niere, der weiblichen Brustdrüse und sehr selten und inkonstant in fetalem Dünndarm immunhistochemisch nachgewiesen (Chessels et al. 1977, Ritz et al. 1980/81, Metzgar et al. 1981, Clavell et al. 1983, Carrel et al. 1983).

Ein von Grogan et al. 1985 beschriebenes intrakanalikuläres Vorkommen von CALLA in der Leber des Erwachsenen war für diese Arbeit von Bedeutung und sollte später im direkten immunhistochemischen Vergleich zu BGP-I überprüft werden.

Das CALLA hat heute eine klinische Bedeutung bei der Diagnosesicherung und Verlaufskontrolle sowie der Festlegung der Prognose von Erkrankungen des lymphopoetischen Systems beim Erwachsenen und bei Kindern (Chessels et al. 1977, Nadler et al. 1981).

Zu 2.7. CA-19-9 (Carboanhydrate Antigen 19-9)

Gegen dieses Monosialogangliosid, mit einem Molekulargewicht von 36.000 Dalton läßt sich ein monoklonaler IgG-Antikörper (Koprowski et al. 1979), gewonnen aus der Immunisierung von Mäusen, mit einer humanen colorektalen Karzinomzelllinie richten. Dieses Monosialogangliosid entspricht einem Hapten der menschlichen Lewis-A-Blutgruppenderminante. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte das CA-19-9 in verschiedenen Karzinomen wie z.B. des Pankreas, der Leber, des Magens und Colons, seltener der Mamma, der Lunge und beim mucinösen Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Atkinson et al. 1982, Magnani et al. 1983/84).

Erhöhte Serumspiegel fanden sich bei benignen Lebererkrankungen die mit diffusen Leberzellnekrosen einhergehen, bei der primär biliären Zirrhose und beim primären cholangiozellulären Leberkarzinom, selten dagegen bei einem Verschuß der abführenden Gallenwege (Atkinson et al. 1982, Magnani et al. 1983/84, Del Villano et al. 1983).

Zur Indikation der CA-19-9 Bestimmung zählen das ductale Pankreaskarzinom, das cholangiozelluläre Leberkarzinom und das Magenkarzinom vom intestinalen Typ, sowie ihre Therapiekontrolle, Verlaufs- und Nachsorgeüberwachung (Klapdor et al. 1984/85, Staab et al. 1985).

3. Grundprinzipien der Indirekten-Immunperoxidase-Technik (IOP)

In der vorliegenden Arbeit wurde für die immunhistochemische Untersuchung der Gewebe die IOP-Technik, ein heute breit eingeführtes Verfahren, verwendet (Nakane et al. 1966/75, Schäfer et al. 1968, Heydermann et al. 1977, Meister et al. 1980, Nathrath et al. 1982).

Hierbei wird der spezifische Antikörper (z.B. A-BGP-I, s. dazu Schema 3), der die im Gewebe befindlichen Antigenloci nachweisen soll, nicht direkt enzymgekoppelt, sondern ein zweiter und unspezifischer Antikörper (z.B. PO 19, s. dazu S. 23) zwischengeschaltet.

Dieser zweite unspezifische und mit Glutaraldehyd an IgG gekoppelte sogenannte "Farbantikörper" (Avrameas et al. 1969 a, b) vermag nun mit Hilfe einer Farbreaktion, die er katalysiert, den ursprünglichen Antigenlocus indirekt nachzuweisen und somit für das Mikroskop sichtbar zu machen.

Zuvor wurden die unspezifischen Antigenloci mit ebenfalls unspezifischem Normalserum (z.B. NKS, d.h. normales Kaninchenserum, s. S. 23) abgesättigt, um keine dem spezifischen Antigenlocus nicht entsprechende Farbreaktion zu erhalten. Außerdem mußte vor dem Aufbringen der exogenen Peroxidase die im Gewebe befindliche endogene Peroxidase, die selbst diese Farbreaktion katalysieren und somit ebenfalls zu unspezifischen Anfärbungen führen könnte, blockiert werden (s. dazu auch unter Durchführung der IOP-Technik S. 36).



Schema 3: Die schematische Darstellung zeigt das Prinzip der "Indirekten Immunperoxidase-Technik (IOP)" an Hand eines Beispiels für den BGP-I-Nachweis

-  Nachzuweisendes Antigen (BGP-I)
-  Erster und spezifischer Antikörper (A-BGP I)
-  Zweiter und unspezifischer enzymgekoppelter "Antikörper" (mit Glutaraldehyd an IgG gekoppelte Meerrettichperoxidase, z.B. hier PO-19)
-  Farbstoff (ACE)
-  Unspezifisches NZS, das andere unspezifische Antigene blockiert
-  Andere unspezifische Antigene

II. MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIAL:

1.1 Lösungen und Substanzen

- Serumglycerin (Firma Chroma, Stuttgart)
- Xylol (rein) und Alkohol in verschiedenen Verdünnungen (absolut, 96% und 70%)
- Natriumborhydrid 0.02% (Merck-Schuchardt, Art. 806373, 40 mg Trockensubstanz $NaBH_4$ auf 200 ml dest. Wasser)
- Wasserstoffperoxid 7,5% (Merck-Darmstadt Art. 7209 / 30%)
- Perjodsäure 2,28% (Merck-Darmstadt, Art. 524)
- Brij-35 Solution 1% (Sigma Chemical Company, Stock Nr. 430 A 6-6, Lot Nr. 82 F-6068, 30% mit PBS auf 1% verdünnen). Das Brij gehört zur Gruppe der Tenside, die durch Herabsetzung der Oberflächenspannung in Flüssigkeiten deren Benetzbarkeit auf Grenzflächen wesentlich verbessert.
- PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,01 molar

Herstellung und Zusammensetzung:

- 42,5 g Natriumchlorid ($NaCl$),
- 6,3 g Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat (NaH_2PO_4) und
- 1,95 g Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Na_2HPO_4) werden in 3,5 Litern destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mittels pH-Meter auf einen Wert zwischen pH 7,2 bis 7,4, eingestellt. Danach erfolgt ein Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 5 Litern ebenfalls mit destilliertem Wasser.
- ACE-Farblösung

Zutaten und Herstellung:

- Michaelispuffer 0,1 molar (5,5 Dimethylbarbitursäure-Natriumsalz, Merck Art. 6318). Davon werden 20,6 Gramm auf 1000 ml destilliertes Wasser gegeben und mit 1 molarer Salzsäure auf einen pH von 7,4 eingestellt. Die dabei ausfallenden Salze werden abfiltriert.

- 20 mg ACE Trockensubstanz (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Firma Sigma, No. A 5754 Approx. 90%, Best. Nr. 63 F-0155/1893) werden in 12 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck-Schuchardt, Art. 80-2912) gelöst und der Ansatz für 20 Minuten stengelassen. Dann werden der eingestellte Michaelispuffer und die ACE-Farblösung zusammengeschüttet und auf ein Gesamtvolumen von 200 ml (mit dest. Wasser) aufgefüllt. Zu dieser Farblösung werden noch 10 μ l 30% H_2O_2 pipettiert, um die Farbreaktion zu starten. Anschließend wird das Ganze noch einmal gemischt.

- Mayer's Hämalaun (Merck, Art. 4305, mit Natriumjodid angesetzt)
- Kaiser's Glyceringelatine (Merck, Art. 9242)

(Alle angegebenen Konzentrationen wurden immer beibehalten).

1.2 Unspezifische Antiseren und sonstige verwendete Substanzen (mit den entsprechenden Verdünnungen)

- **Pronase:**

(= Protease in 1% Konzentration, Firma Sigma, Typ 7, P 5255 mit einer Aktivität von 6-9 Units/mg). Einige frühe Versuchsreihen wurden mit Pronase vorbehandelt, um zu überprüfen, ob ein besseres Anfärbeergebnis erzielt werden kann.

- **Pepsin:**

(= Trypsin in einer Konzentration von 1 mg/ml 0.5 molarer Essigsäure, Firma Sigma, P 7012). Bei Verwendung von Prokollagen-III als spezifisches "Antigen" mußten die Schnitte mit Pepsin vorbehandelt werden.

- **Normales Ziegen Serum:**

(NZS, Herstellerfirma Nordic, immunological Laboratories, Tielburg, Niederlande, Code Nr. 30-285). Zu 1 ml lyophilisiertem Ziegennormalserum (1 ml dest. Wasser und entspr. Trockensubstanz für 20 Minuten stehenlassen) wurden 20 ml PBS (Phosphate buffered saline 0.01 molar) zugegeben, daß somit eine Gesamtverdünnung von 1:21 erreicht wurde. Dieser Ansatz fand Verwendung bei den polyklonalen spezifischen Antiseren.

- **Normales Kaninchenserum:**

(NKS, Firma Nordic, Code Nr. 48-285). Zu 1 ml lyophilisiertem NKS (1 ml dest. Wasser mit der Trockensubstanz gemischt und 20 Minuten stehengelassen) wurden jeweils 9 ml PBS zugegeben, so daß eine Verdünnung von 1:10 erreicht wurde. Anwendung bei monoklonalen Antiseren.

- **Meerrettichperoxidase (PO-19):**

Mit Glutaraldehyd gekoppeltes, Anti-Kaninchen-Immunglobulin-G von der Ziege (PO 19, Hersteller Miles Scientific, Naperville, U.S.A.) wurde in den ermittelten Verdünnungen von 1:450 (Lot E 248), 1:700 (Lot E 207) und 1:810 (Lot E 061) verwendet.

- **Meerrettichperoxidase (PO-91):**

Mit Glutaraldehyd gekoppeltes, gegen die Maus gerichtetes Immunglobulin der Klasse G vom Kaninchen (PO 91, Firma Dako-Boehringer, Lot 051) wurde auf 1:200 verdünnt.

Die PO 19 wurde bei polyklonalen, die PO 91 bei monoklonalen spezifischen Antiseren verwendet.

1.3 Spezifische Antiseren (mit den entsprechenden Verdünnungen)

1.3.1 A-BGP-I (Anti-Biliäres Glycoprotein I, polyklonal)

Zur Isolierung von BGP I wurden gepoolte Gallensäureproben von Patienten mit cholestatischen Leber- bzw. Gallengangserkrankungen mit Perchlorsäure (PCA) extrahiert (nach Svenberg et al. 1976, durchgeführt von Prof. Lamerz, II. Med. Abt., Klinikum Großhadern). Das so gewonnene BGP I wurde anschließend zur Immunisierung von Kaninchen und als Tracer für Radioimmunassays verwendet (vor der Immunisierung wurde das BGP I noch gegen CEA und NCA absorbiert). Anschließend wurde das vom Kaninchen erhaltene BGP I Antiserum (A-BGP I) noch mit Human-Normalserum, A/B Erythrozyten, normalem-Lungen- PCA-Extract und an Leber- und CEA-Säulen absorbiert (Stieber, 1986).

Diese Absorptionsvorgänge waren vor allem deshalb notwendig, da sowohl bei Anti-BGP I als auch A-CEA und A-NCA zur Gewinnung dieselbe Methode - Perchlorsäureextraktion - Verwendung findet, und bei der Isolierung eines der Antigene daher immer mit Verunreinigungen der jeweils beiden anderen kreuzreagierenden Antigene gerechnet werden muß. Die IgG-Fraktion des gereinigten Antiserums wurde dann durch Protein-A-Saccharose-Chromatographie (gleiches Verfahren wie bei CEA und NCA) gewonnen.

Als Kriterium für die histologische Spezifität vom A-BGP I Serum wurde eine deutliche Anfärbbarkeit der intrahepatischen Gallenkapillaren gewertet (siehe auch Tabelle 2, S. 30).

Neben dieser immunhistologischen Überprüfung wurden noch Spezifitätsuntersuchungen mit Hilfe der Immundiffusionstechnik (s. Abb. 1, nach Ouchterlony, gegen verschiedene Perchlorsäure-Extrakte von Leber, Lunge, CEA und BGP-I und eine Messung immunologischer Bindungsaffinitäten (Abb. 2) durchgeführt (Prof. Lamerz, II. Med. Abt. Klinikum Großhadern).

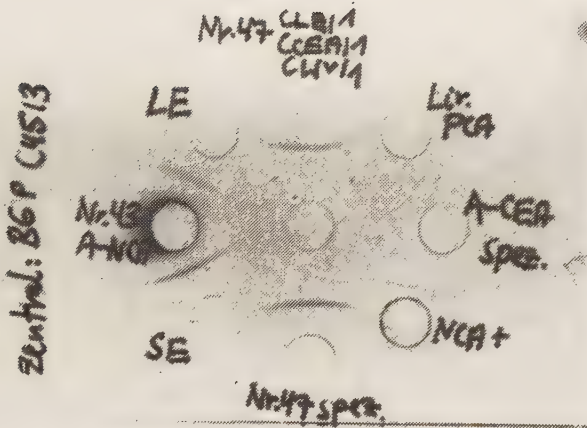


Abb. 1:

Die Abbildung zeigt eine Doppeldiffusionsuntersuchung nach Ouchterlony.
(Prof. Lamerz)

Zu Abb. 1:

Gereinigte BGP-I liegt zentral. LE (Perchlorsäure-Lungenextrakt), LIV-PCA (Perchlorsäure-Leberextrakt), NCA+ (Perchlorsäure extrahiertes NCA), SE (Perchlorsäure Milzextrakt), A-CEAspecial (A-CEA-Serum) A - NCA₄₃ (A-NCA-Serum) und Nr. 47 special (A-BGP-I-Serum). Die BGP Präparation Nummer 47 reagiert ausschließlich und spezifisch mit der gereinigten BGP-I-Fraktion, das A-NCA nur mit Lungen und Milz-Extrakt, das A-CEA nicht mit NCA, Leber-Extrakt und dem BGP-I.

SPECIFICITY OF ANTI-BGP - ANTISERUM Nr. 47 (IgG)

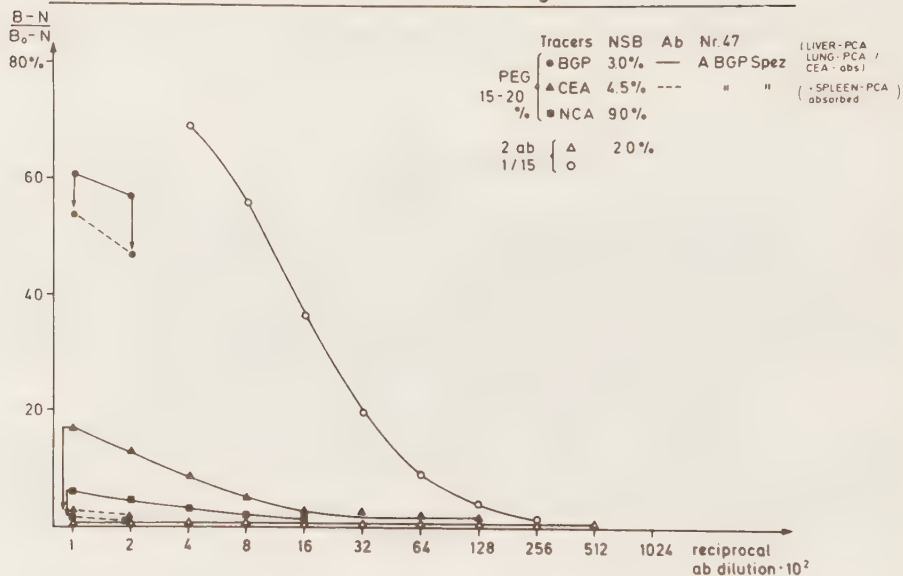


Abb. 2:

Die Abbildung zeigt eine Untersuchung von Anti-BGP-Serum auf seine Spezifität (Prof. Lamerz).

Polyklonales Anti-BGP-Serum vom Kaninchen (Nr. 47) wurde mit Leber- und Lungen-PCA-Extrakt sowie mit CEA (Affinitätschromatographie) absorbiert. Dieses Antiserum (A-BGP-Spezial) ergab eine maximale Bindung mit dem BGP-Tracer von 70% (Verdünnung 1:400, Doppel-Antikörper-RIA) bzw. 62% (PEG-Fällung der Immunkomplexe), mit dem CEA-Tracer keine Bindung (Doppel-Antikörper-Test) bzw. eine Bindung von 18% (Verdünnung 1:100, PEG) und mit dem NCA-Tracer eine Bindung von 6% (Verdünnung 1:100, PEG) bei tracerabhängigen unterschiedlichen und unspezifischen Bindungen zwischen 3% und 9% (PEG).

Nach weiterer Absorption des verwendeten Antiserums mit Milz-Extrakt nahm die Bindung mit dem BGP-Tracer um 6% - 10% ab (60% auf 54%, PEG), während die Bindung mit dem CEA- und NCA-Tracer auf unter 4% gesenkt werden konnte (Verdünnung 1:100, PEG) und damit vernachlässigbar war.

Zur Feststellung der optimalen Verdünnung von A-BGP-I Serum wurden Gewebeschnitte von Lebern gesunder Erwachsener verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich die intrahepatischen Gallenkapillaren gut darstellten (s. in der Bildübersicht S. 30) während eine unspezifische Hintergrundaktivität ausbleiben sollte. Die optimale Verdünnung war hierfür 1:300. Verdünnt wurde, wie auch bei den anderen Antiseren, mit Phosphate buffered saline (PBS).

1.3.2 A-CEA (ANTI-CARCINOEMBRYONALES-ANTIGEN, POLYKLONAL)

Als Ausgangsserum wurde handelsübliches Kaninchenimmunglobulin (Firma Dakopatts, Dänemark Lot 061A, Exp. 0687) das gegen humanes CEA gerichtet ist, verwendet. Dieses Antiserum wurde dann noch wegen starker Verunreinigungen durch Antikörper gegen humane Blutgruppensubstanzen und Plasmaproteine, sowie wegen starker Kreuzreaktionen mit NCA mit Milz- und Lungenextrakt nachabsorbiert (Prof. Lamerz, II. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern der LMU).

Das auf diese Weise gereinigte A-CEA, nun A-CEA abs., reagierte im Ouchterlony-Test nur noch mit ebenfalls gereinigtem A-CEA Serum, nicht mehr aber mit NCA aus Lungenextrakt.

Zur Austestung der Verdünnung wurden verschiedene, normale Dickdarmschleimhäute von Erwachsenen verwendet, die schon bei einer CEA Ausgangsverdünnung von 1:100 sehr ähnliche Färbeergebnisse erbrachten. Die Endverdünnung wurde dann jeweils als optimal angesehen, wenn eine deutliche vor allem zytoplasmatisch gelegene und auch schwach ausgeprägte apicale Anfärbung bei fehlender unspezifischer Hintergrundaktivität erfolgte (siehe Bildübersicht hinten, S.30). Als beste Verdünnung wurde hierfür ein Wert bei 1:300 ermittelt.

1.3.3 MONOKLONALES ANTI-CEA SERUM

Hier von wurden verschiedene Präparationen - in den Titerstufen unverdünnt bis 1:200 verdünnt - verwendet. BW 431/26, BW 431/31 (gereinigt, 1,5mg/ml) und BW 250/153 (aus Aszites, 2mg/ml alle BW-Präparationen stammen von Prof. Lamerz, Klinikum Großhadern der LMU), MAB-A-CEA H-5 H-5 (Freundlicherweise überlassen von Prof. Burtin, Inst. de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Villejuif, 1985), und MAB-A-CEA (Firma Hoechst AG).

Da diese Antiseren von der Maus stammten, wurde als zweiter und unspezifischer Antikörper die PO-91 ein Kaninchen anti-Maus Immunglobulin und normales Kaninchenserum verwendet. Da aber bei allen Titerstufen eine starke Kreuzreaktion mit NCA bestand, mußte auf eine weitere Verwendung dieser Antiseren verzichtet werden.

1.3.4 A-NCA (ANTI-NONSPECIFIC-CROSSREACTING-ANTIGEN, POLYKLONAL)

Von diesem Antiserum wurden zwei Präparationen eingesetzt, das A - NCA₄₃ und das A - NCA₄₆ (beide mit 90.000 Daltons, ebenfalls von Prof. Lamerz zur Verfügung gestellt).

Um nun unspezifische Kreuzreaktionen zu vermeiden, wurden auch diese Antiseren mit normalem Humanserum, A/B Erythrozyten und an einer CEA-Extrakt-Säule nachabsorbiert. Anschließend wurde noch mit Protein-A-Sephrose reines Immunglobulin entfernt (NCA), so daß nur noch spezifisches A-NCA Serum vorhanden war (Prof. Lamerz).

Zur Überprüfung der Gewebsspezifität wurden die in der Literatur (Darcy et al, 1973, Burtin et al., 1975/86, Nap et al. 1984, Ahrends et al, 1985) als A-NCA positiv beschriebenen Gewebe (Lunge, Milz und Knochenmark: Granulozyten, Lunge: Alveolarepithel und das Epithel von größeren Pankreasgängen untersucht (siehe Bildübersicht, S. 30).

Für die A-NCA-Seren wurden Verdünnungen gewählt, mit denen sich NCA-positive Gewebe gut anfärben, aber dennoch keine unspezifische Hintergrundaktivität auftrat. Die beste Verdünnung lag für das A - NCA₄₃ Serum bei 1:300 und für das A - NCA₄₆ Serum bei 1:800.

1.3.5 MONOKLONALES ANTI-NCA SERUM

Hiervon wurden ebenfalls mehrere Präparationen verwendet: ein A-NCA 4+33, A-NCA 4+18 und ein A-NCA 18+33 (alle freundlicherweise von Prof. Burtin überlassen).

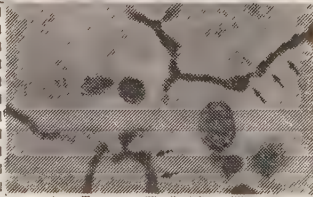
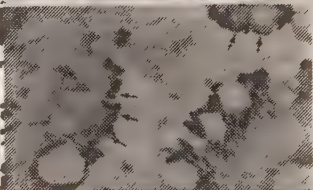
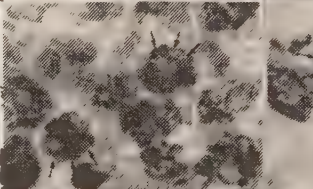
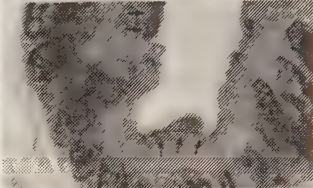
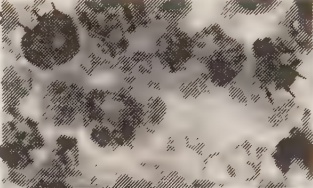
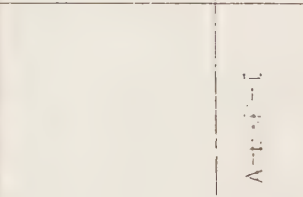
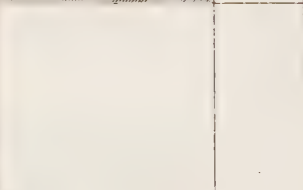
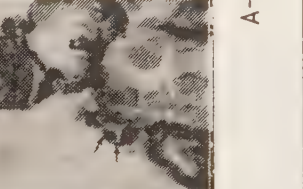
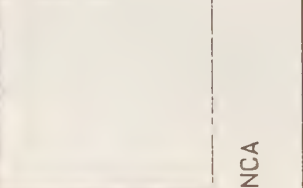
Als Maß für die richtige Verdünnung galt die Anfärbbarkeit der Granulozyten in der Milz und im Knochenmark, die bei verschiedenen Titerstufen sowie bei unverdünntem Antiserum sehr schwach ausgeprägt war. Wegen dieser Tatsache, und da von dem monoklonalen Antiserum nur wenig Material zur Verfügung stand, kam eine breite Anwendung für diese Arbeit nicht in Betracht. Da auch dieses monoklonale A-NCA von der Maus stammte, wurden ebenfalls als zweiter und unspezifischer Antikörper (wie auch beim monoklonalen A-CEA-Serum) die PO-91 und das normale Kaninchenserum (NKS) verwendet.

Tabelle 2:

Übersicht der geforderten Gewebsspezifität der in dieser Studie verwendeten polyklonalen Antiseren für eine gewebshistologische Charakterisierung. Die Angaben in der Tabelle beziehen sich, außer der Leber, auf Gewebe des Erwachsenen.

Untere Bildhälfte:

Beispiele für das immunohistochemische Reaktionsverhalten. Immunperoxidase-Technik; X1000

	Leber: (fetal) Gallenkapillaren	Colon Mucosa	Milz: Granulozyten Lunge: Granulozyten Makrophagen Alveolarepithel	Pankreas: Gänge	Knochenmark: Granulozyten
A-BGP I	+++	+	-	-	-
A-CEA (abs.)	-	.	-	-	-
A-NCA (43+46)	-	(+) inkonst.	+++	++	+++
					
					
	A-T: +++		A-NCA		

1.3.6 A-AFP (ANTI-ALPHA-FETOPROTEIN, POLYKLONAL)

Das in dieser Studie verwendete A-AFP (Firma Dako, Kaninchen anti Mensch, Code A 008, Lot. 109 D, Titre 86, Exp. 1085, freundlicherweise überlassen von Dr. Nathrath) wurde auf 1:100 (Erfahrungswert von Dr. Nathrath) verdünnt.

Dieser Antikörper wurde nur bei der Untersuchung der Leber eingesetzt, da dies einerseits das hierfür interessierende Organ war, andererseits nur sehr wenig A-AFP zur Verfügung stand. (Des weiteren Verwendung von NKS und PO-19).

1.3.7 ANTI-PROKOLLAGEN III (= AMINOTERMINALES-A-PROKOLLAGEN III = A-N-PP-III, POLYKLONAL)

Um das N-PP-III im Gewebe nachweisen zu können, müssen die Präparateschnitte mit Pepsinlösung vorbehandelt werden. Dies ist deshalb nötig, da durch die, bei der Formalinfixierung entstandenen Formalinniederschläge, die Antigendeterminanten (-Epitope) des nachzuweisenden N-PP-III maskiert worden sind, und diese somit erst wieder für eine immunologische Reaktion zugänglich gemacht werden müssen. (Gay et al. 1975, Nowack et al. 1976, Ott et al. 1977, Biempica et al. 1980, Konomi et al. 1981). Dann erst kann mit dem spezifischen Antikörper, dem A-N-PP-III (freundlicherweise von Prof. Lamerz zur Verfügung gestellt) inkubiert werden.

Zur Ermittlung der richtigen Verdünnung des N-PP-III-Antiserums wurde als histologischer Parameter die gesunde Leber von Erwachsenen herangezogen. Hierbei war darauf zu achten (Hahn et al. 1980a,b), daß sich das Portalfeld in der Leber deutlich durch die Darstellung der periportalten Kollagenfasern (dem Prokollagen-III) vom umgebenden Leberparenchym abgrenzen ließ (Gay et al. 1975, Nowack et al., 1976, Hahn et al. 1980b).

Dies konnte, ohne eine störende unspezifische Hintergrundaktivität auszulösen, am besten bei einer Endverdünnung von 1:50 erreicht werden. (Des weiteren Verwendung von NZS und der PO-19).

1.3.8 A-CALLA (ANTI-COMMON AKUTE LYMPHOBLASTIK LEUKEMIA-ASSOCIATED ANTIGEN, MONOKLONAL)

Von diesem monoklonalen Antikörper wurden zwei verschiedene Präparationen (A-CALLA, J5, Firma Coulter Cloné und A-CALLA, Firma Becton Dickinson) freundlicherweise überlassen von Dr. Ch. Nerl, I. Medizinische Abteilung, Städtisches Krankenhaus München-Schwabing) verwendet.

Um ein verwertbares Anfärbeergebnis zu erzielen, wurden die Gewebeschnitte auf Grund eigener Vorversuche jeweils mit Pronase und Pepsin vorbehandelt (siehe auch hinten, S. 35). Nach anfänglichen Proben zeigte sich eine Verdünnung von 1:50 am günstigsten, um einerseits ein gutes Anfärbeergebnis zu erreichen, andererseits aber keine störende Hintergrundaktivität zu verursachen. (Des weiteren Verwendung von NKS und PO-91).

1.3.9 A-CA-19-9 (ANTI-CARBOHYDRATE-ANTIGEN 19-9, MONOKLONAL)

Dieser monoklonale Antikörper wurde bei einigen malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes mituntersucht (Firma Mallinckrodt, Diessenbach, freundlicherweise von Prof. Lamerz zur Verfügung gestellt).

Zur Festlegung der richtigen Verdünnung wurde ein duktales Pankreaskarzinom herangezogen, wobei sich das A-CA-19-9 in den größeren Pankreasgängen kräftig intrazytoplasmatisch und luminal darstellen sollte, ohne dabei eine unspezifische Hintergrundaktivität zu verursachen. Dies konnte am besten bei einer Verdünnung von 1:200 erreicht werden. (des weiteren Verwendung von PO-91 und NKS)

1.4 PROBEN FÜR DIE SPEZIFISCHEN ANTISEREN

Bei jeder Versuchsreihe wurde darauf geachtet, daß immer für A-BGP I, A-CEA abs und $A-NC A_{43+46}$ ausgetestete und somit in ihrer Farbeintensität bekannte Präparate als Vergleichsstandards mitliefen. Dadurch konnten Versuchsreihen, in denen die Farbreaktion versuchsablaufbedingt zu schwach oder verändert ausfiel, eliminiert werden.

Außerdem wurde streng darauf geachtet, daß sich nach Inkubation der Gewebeschnitte mit dem spezifischen Antikörper (z.B. A-BGP I) nur eine Spezies von Antikörpern (z.B. nur A-BGP I geträufelte Schnitte) in einer Küvette befand, um nicht eventuell durch Vermischung des abgetropften Überstandes verschiedener Antiseren, eine nicht zu kontrollierende Kreuzreaktion auszulösen.

1.5 PROBEN FÜR DIE PEROXIDASEN (S. 37)

2. METHODEN:

2.1 Vorbereitung zur praktischen Durchführung der Versuche

Für diese Arbeit wurden ausschließlich in 10%igem Formalin fixierte und anschließend in Paraffin eingebettete Gewebeproben verwendet (s. eine Zusammenstellung in der Tabelle 4, S. 72ff).

Dabei handelt es sich um Resektate, Biopsien und Obduktionsmaterial des Pathologischen Institutes der LMU aus den Jahren 1975 bis 1987.

Davon wurden mit dem Mikrotom 4 bis 5 µm dicke Dünnschnitte angefertigt und auf zuvor mit Serumglycerin bestrichene Objektträger aufgebracht, um ein Abschwimmen während des Färbeprozesses zu verhindern. Anschließend kamen die Schnitte für mindestens 12 Stunden bei 60°C in den Wärmeschrank, wodurch die Adhäsion der Gewebe auf den Objektträgern noch einmal verbessert werden konnte.

Nachabsorption von A-BGP-I

Im Rahmen der Vorversuche zeigte sich neben einer BGP-I Anfärbung in den intrahepatischen Gallenkapillaren eine starke Färbung in Lebermetastasen colorektaler Karzinome. Wegen der Vermutung, daß es sich bei BGP-I um ein CEA handeln könnte, das lediglich mit der Galle in den Darm ausgeschieden wird, wurde das BGP-I noch gegen Erwachsenenleber nachabsorbiert. Daraus resultierte das A-BGP-I-Spezial, welches im weiteren Verlauf der Studie Anwendung fand.

2.3 DURCHFÜHRUNG DER INDIREKTEN IMMUNPEROXIDASE-TECHNIK (IOP)

(Alle Verdünnungen der hier angegebenen Substanzen siehe vorne S. 21ff)

Behandlungsschritte:

1. Entparaffinierung der Schnitte und Überführung in die wäßrige Phase
2. Versuchsweise Vorbehandlung mit Pronase bzw. Vorbehandlung mit Pepsin (Pronase bei A-BGP-I-Spezial, A-CEA, A – NCA₄₃₊₄₆, Pepsin bei A-N-PP-III, Pronase + Pepsin bei A-CALLA)
3. Blockade der endogenen Peroxidase
4. Aufbringen von NZS (für polyklonale Ak.) oder NKS (für monoklonale Antikörper). Die Schritte 3 und 4 dienen beide einer Reduktion der unspezifischen Hintergrundaktivität.
5. Auftröpfeln der spezifischen Antiseren (A-BGP-I-Spezial, A-CEA poly- und monoklonal, A-NCA poly- und monoklonal, A-N-PP-III, A-AFP, A-CA-19-9, und A-CALLA)
6. Inkubation mit der Peroxidase (PO-19 für polyklonale Antiseren, PO-91 für monoklonale Antiseren) als dem wesentlichen Bestandteil der IOP
7. Anfärbung der gebildeten Ag/Ak-Komplexe mit ACE
8. Kerngegenfärbung mit Hämalaun
9. Haltbarmachung der Gewebeschnitte durch Eindecken mit Kaisers Gelatine
10. Beurteilung der erhaltenen Anfärbungen

Zu 1.)

Die Entparaffinierung erfolgte zunächst in Xylol für zweimal 5 Minuten. Danach wurden die Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe in die wäßrige Phase zurücküberführt, in der auch alle übrigen Reaktionsschritte ablaufen sollten. Anschließendes Einstellen in destilliertes Wasser für zweimal 5 Minuten.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß jegliche Inkubationszeiten im folgenden in sogenannten feuchten Kammern absolviert wurden, um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern. Dies würde, neben unkalkulierbaren Veränderungen in der Anfärbbarkeit, ein Ablösen der Dünnschnitte durch Schrumpfungsprozesse begünstigen.

Zu 2.)

In Anlehnung an die Erkenntnis Björnkunds (Björnkund et al. 1982/84) für das "Tissue Polypeptid Antigen", daß durch die bei der Formalinfixierung entstandenen Formalinniederschläge Antigenloci in Geweben maskiert werden können, und daraus eine verminderte Anfärbbarkeit resultiert, wurden mehrere Versuchsreihen für A-BGP-I, A-CEA-abs, A - NCA₄₃₊₄₆ und A-N-PP-III, insgesamt über 200 Schnitte, mit Pronase vorbehandelt, und zwar durch 30-minütige Inkubation mit 1% Pronase bei Zimmertemperatur in der feuchten Kammer. Anschließendes Stehenlassen in kaltem PBS - im Kühlschrank - für eine Stunde.

Bei diesen Vorversuchen zeigte sich aber, daß keine eindeutig verbesserte Anfärbbarkeit für die verwendeten Antiseren erreicht werden konnte, so daß im weiteren Verlauf dieser Studie auf eine Vorbehandlung mit Pronase verzichtet wurde.

Bei der Verarbeitung von A-N-PP-III bzw. des A-CALLA mußten die Gewebeschnitte mit Pepsin bzw. Pronase und Pepsin - Inkubationszeit für zwei Stunden bei 37°C in der feuchten Kammer - vorbehandelt werden, um die Antigendeterminanten, die durch Formalinniederschläge, entstanden bei der Formalinfixierung, blockiert waren, wieder zu demaskieren und somit für die immunhistochemische Untersuchung zugänglich zu machen (Gay et al. 1975, Nowack et al. 1976a, Ott et al. 1977, Biempica et al. 1980).

Zu 3.) und 4.)

Diese Reaktionsschritte dienen beide einer Reduktion der unspezifischen Hintergrundaktivität.

Zu 3.)

Die Blockade der endogenen Peroxidase erfolgte in nachstehender Reihenfolge:

Einstellen in

1. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) für 5 Minuten, danach 5-minütige Wässerung,
2. Perjodsäure für 5 Minuten, anschließend 5-minütige Wässerung,
3. Natriumborhydrid für 2 Minuten, danach Einstellen in phosphate buffered saline (PBS) für zweimal 5 Minuten.

Dabei sollte das Natriumborhydrid die in den ersten beiden Behandlungsschritten entstandenen Aldehydgruppen, als einen weiteren möglichen Störfaktor für die Anfärbung, bindungsmäßig abdecken (Nathrath et al. 1982).

Zu 4.)

Danach wurde mit dem Normalserum (NKS oder NZS) für 10 Minuten inkubiert. Anschließendes Einstellen für zweimal 5 Minuten in PBS.

Zu 5.)

Nun wurden die entsprechenden spezifischen Antikörper wie A-BGP-I-Spezial, A-CEA abs, A-NCA₄₃₊₄₆, A-AFP, A-N-PP-III, A-CA-19-9 (monoklonal), A-CALLA (monoklonal) in ihren jeweiligen Verdünnungen (siehe unter den einzelnen spezifischen Antiseren) aufpipettiert. Inkubationszeit jeweils 15 Minuten, bei A-N-PP-III für 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur, anschließendes Einstellen für zweimal 5 Minuten in Brij-Lösung.

Zu 6.)

Jetzt wurde der zweite und "unspezifische Antikörper", die enzymgekoppelte Meerrettichperoxidase, aufgebracht (die PO 19 für alle polyklonalen Antiseren und A-N-PP-III, die PO 91 für alle monoklonalen Antiseren wie das A-CA-19-9 und das A-CALLA). Inkubationszeit in der feuchten Kammer für jeweils 15 Minuten, danach Wässerung in Brij-Lösung für zweimal 5 Minuten.

PBS-Kontrollen (2.3.1)

Zur Kontrolle, ob die Peroxidasen (PO 19 und PO 91) richtig eingestellt waren, wurden sog. PBS-Kontrollen durchgeführt.

Hierfür wurden die Gewebeschnitte, statt im spezifischen Antiserum, im PBS stehengelassen und nach dem Färbevorgang beobachtet, ob sich unspezifische Anfärbungen ergaben. War dies der Fall, so wurde die Verdünnung der entsprechenden Peroxidase solange verändert, bis keine unspezifische Hintergrundaktivität mehr auftrat.

Eine unspezifische Hintergrundfärbung konnte sich auch noch ergeben, wenn die endogene Peroxidase nicht ausreichend blockiert war, oder noch Formalinniederschläge, bedingt durch die Fixierung mit Formalin, im Präparateschnitt vorhanden waren.

Zu 7.)

Für den spezifischen Färbevorgang wurde das Chromogen ACE als Wasserstoffdonator (Graham et al. 1965) in der peroxidase-katalysierten Reaktion verwendet. Der dabei entstehende rot-braune Farbstoff liefert eine dauerhafte Anfärbung (Schäfer et al. 1968).

Einstellen der Schnitte für 30 Minuten in die ACE-Lösung unter dem Abzug, danach 10-minütige Wässerung in fließendem Leitungswasser.

Zu 8.)

Als zweiter Färbevorgang erfolgte noch die Kerngegenfärbung mit Hämalaun (Färbezeit: 50 Sekunden), erneute Wässerung für 10 Minuten in fließendem Leitungswasser, dann noch 5-minütiges Einstellen in destilliertem Wasser.

Zu 9.)

Anschließend wurden die Gewebeschnitte durch blasenfreies Eindecken mit Kaisers Gelatine (aus dem Wärmeschrank bei 60°C entnehmen) konserviert.

Zu 10.)

Auswertung des Versuches durch die Beurteilung der erhaltenen Farbintensität.

Die folgenden Abstufungen wurden gewählt und im gesamten Verlauf dieser Arbeit, maßgebend für alle verwendeten Antikörper, beibehalten (siehe die nachfolgende Tabelle).

Tabelle 3: Graduierung der Anfärbungen (2.3.2)

-	Keine Anfärbung nachweisbar
(+)	Eine fraglich positive Anfärbung
+	Eine schwach ausgeprägte Färbung
++	Die Färbung ist deutlich sichtbar
+++	Eine starke bis sehr starke Anfärbbarkeit

III. ERGEBNISSE:

In Übereinstimmung mit Svenberg wurde BGP-I in den Gallenkapillaren (Kanlikuli) der Leber des Erwachsenen nachgewiesen. Kein Nachweis konnte dagegen in den großen abführenden Gallenwegen wie intrahepatische Gallengänge (ductuli interlobares), Ductus Choledochus und der Gallenblase von Erwachsenen erbracht werden (S. Abb. 3).

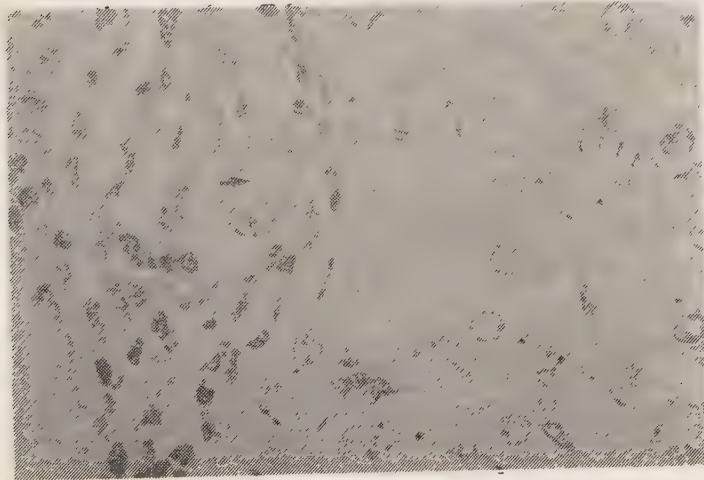


Abb. 3:

Das ursprünglich verwendete A-BGP-I, d.h. nicht absorbiert gegen Leber, zeigt sich positiv in den Kanalikuli (Pfeile), dagegen negativ in den intrahepatischen Gallengängen (dicker Pfeil) der Leber eines gesunden Erwachsenen. IOP-Technik; x 1000.

Überraschenderweise war eine intrahepatische Metastase eines colorektalen Karzinoms ebenfalls stark positiv für A-BGP-I, ebenso für A-CEA (immer Verwendung von $A - CEA_{abs}$) und A-NCA (immer $A - NCA_{43+46}$).

Die hier verwendete A-BGP-I Präparation war zuvor gegen A-CEA, A-NCA, Lungen- und Milzextrakt absorbiert worden.

Auch die Gallenkapillaren in der unmittelbaren Nähe der Metastase eines kolorektalen Karzinoms stellten sich wesentlich stärker dar, als dies der Fall in der gesunden Erwachsenenleber gewesen war (S. Abb. 4).

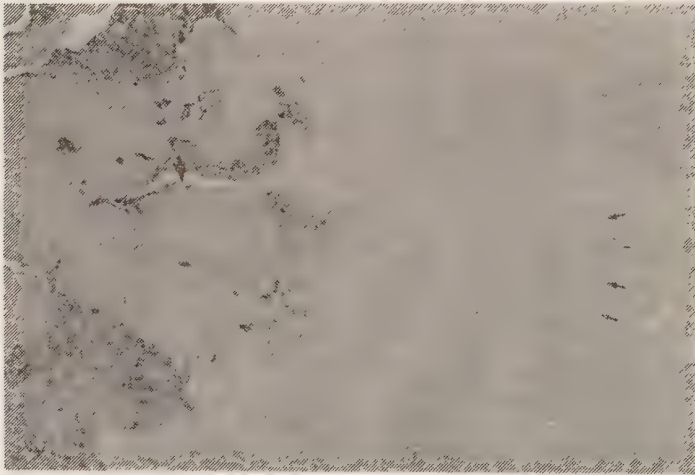


Abb. 4:

Darstellung des A-BGP-I in der Lebermetastase eines kolorektalen Karzinoms. Dabei kommt es besonders in der Umgebung der Metastase zu einer deutlichen Darstellung der Gallenkapillaren (Pfeile). IOP-Technik; x 400.

Im Gegensatz dazu ergab sich für A-CEA und A-NCA keine Aktivität in den intrahepatischen Gallenkapillaren sowie den abführenden Gallenwegen.

Alle untersuchten Lebermetastasen colorektaler Karzinome waren BGP-I positiv. Daher ergab sich die Vermutung, daß es sich bei BGP-I um ein primär intestinales, aber mit der Leber kreuzreagierendes Antigen handeln könnte.

Unter dieser Vermutung wurde das A-BGP-I zusätzlich gegen Leber (Leberextrakt) nachabsorbiert (alle Absorptionen wurden freundlicherweise von Prof. R. Lamerz durchgeführt). Wie schon vorher beobachtet, blieben aber die Gallenkapillaren in der Umgebung der Metastasen und die Metastasen selbst unverändert positiv, während sich dagegen die metastasenfernen Kanalikuli nicht mehr darstellten.

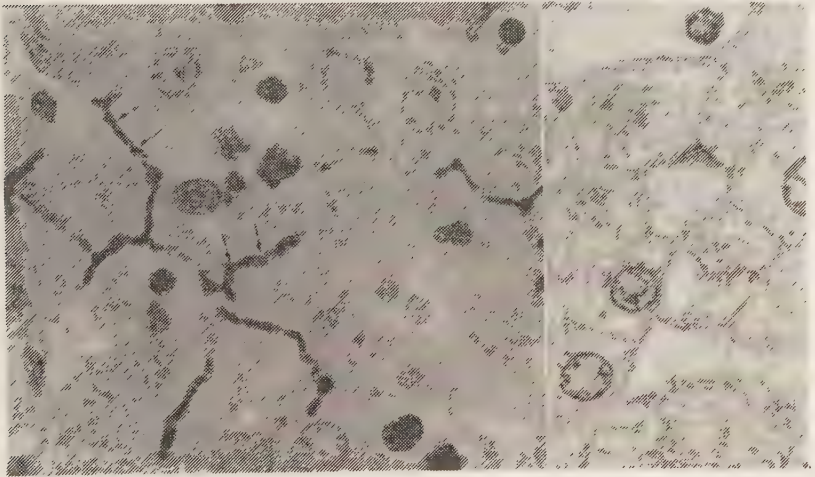


Abb. 5:

links: Starke intrakanalikuläre BGP-I Reaktion in der fetalen Leber (Pfeile) in der 16. Schwangerschaftswoche (ebenfalls nach Absorption gegen Leber),

rechts: fehlende Reaktion in der Leber eines Erwachsenen nach der Leberabsorption, IOP-Technik; x 1000.

Durch die Leberabsorption von A-BGP-I konnte zwar bei der Leber des Erwachsenen eine Anfärbung in den Gallenkapillaren aufgehoben werden, nicht jedoch in der fetalen bzw. embryonalen Leber (Abb. 5)

Wie bereits oben erwähnt, waren die abführenden Gallenwege des Erwachsenen für alle A-BGP-I-Präparationen wie auch für das A-CEA und das A-NCA negativ.

Monoklonale Antikörper gegen CALLA ergaben eine deutliche, diffus zytoplasmatische Reaktion in den Leberzellen. Dabei zeigte der Antikörper von Coulter Cloné eine stärkere Reaktion als der von Becton Dickinson (S. Abb. 6).

Bei Verwendung von A-CALLA zeigte sich in Vorversuchen, daß durch eine Vorbehandlung mit Pronase und Pepsin eine wesentliche Verbesserung im Anfärbeergebnis an formalinfixierten Präparaten erzielt werden konnte. Eine entsprechende Vorbehandlung der übrigen in dieser Studie verwendeten Antikörper führte außer bei A-N-PP-III zu keiner stärkeren Anfärbung.

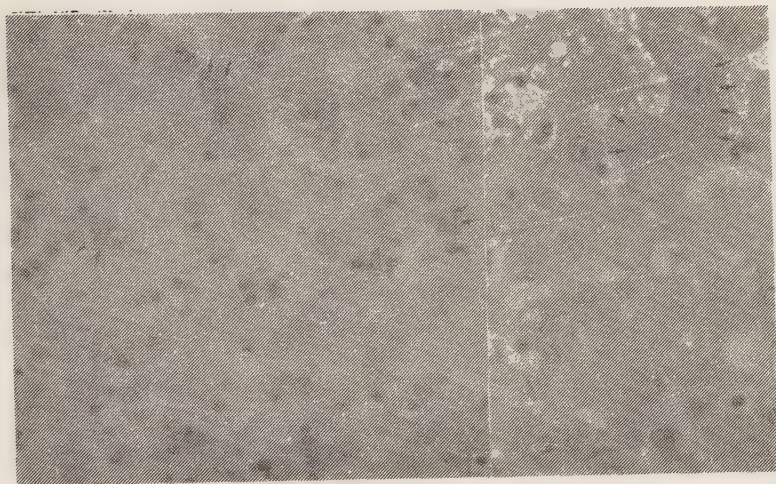


Abb. 6:

CALLA (Coulter Cloné)

links: in fetaler Leber, x 400,

rechts: in adulter Leber, x 1000

Der Reaktionstyp ist jeweils diffus zytoplasmatisch (Pfeile). IOP-Technik.

CA-19-9, ein ebenfalls monoklonaler Antikörper, führte in der normalen Leber bzw. den abführenden Gallenwegen zu keinerlei Anfärbung.

AFP war im normalen hepatobiliären System des Erwachsenen immunhistochemisch nicht nachzuweisen.

Dagegen zeigte sich in der fetalen Gallenblase ab der 12. Schwangerschaftswoche (SSW) eine deutliche, diffus intrazytoplasmatisch gelegene Aktivität (Abb. 7).

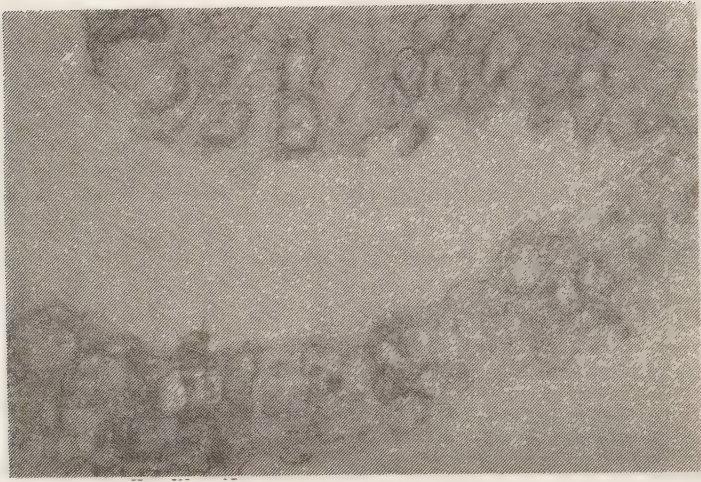


Abb. 7:

Intrazytoplasmatische AFP-Aktivität in der fetalen Gallenblase (13 SSW, Pfeile).
IOP-Technik; x 1000.

Auch die fetale Leber wies, ebenfalls ab der 12. SSW eine besonders periportale und diffus intrazytoplasmatische Reaktion für AFP auf.

Prokollagen-III stellte sich mit faserartigen Formationen im Bereich der Portalfelder und entlang der Sinus dar (S. Abb. 8).

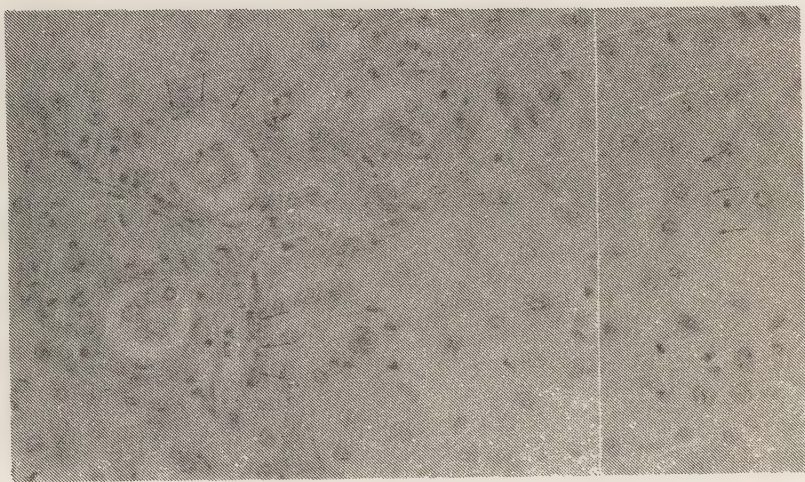


Abb. 8:

Übersichtsaufnahme der Verteilung von N-PP-III in der normalen Leber des Erwachsenen.

Hierbei ist das Prokollagen-III mit faserartigen Formationen im Portalfeld und entlang der Sinus lokalisiert (Pfeile).

Der rechte Bildausschnitt stellt das N-PP-III-Verhalten an von Periportalfeldern entfernt gelegenen Hepatozyten dar. IOP-Technik; x 400.

Während die normalen ableitenden Gallenwege negativ waren, zeigte sich beim Gallenblasenkarzinom des Erwachsenen eine deutliche, diffus zytoplasmatische CEA-Positivität, wogegen eine BGP-1-Anfärbung nicht sicher, eine NCA-Färbung nicht nachzuweisen war (S. Abb. 9).

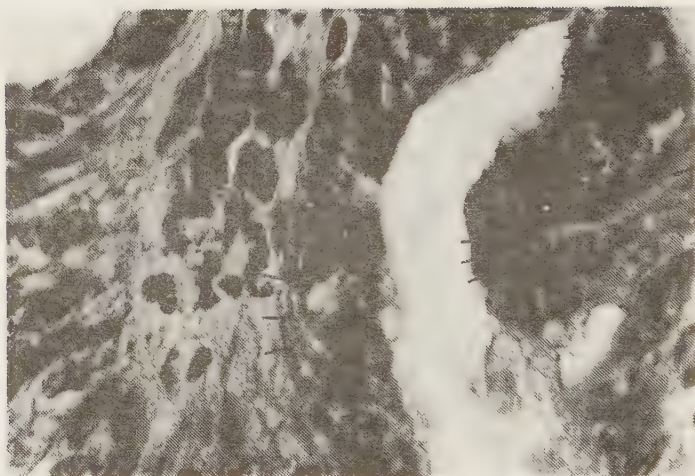


Abb. 9:

Gallenblasenkarzinom des Erwachsenen mit starker, diffus zytoplasmatischer CEA-Anfärbung (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

Von den abführenden fetalen Gallenwegen war nur die fetale Gallenblase zytoplasmatisch schwach für BGP-I positiv (S. Abb. 10).

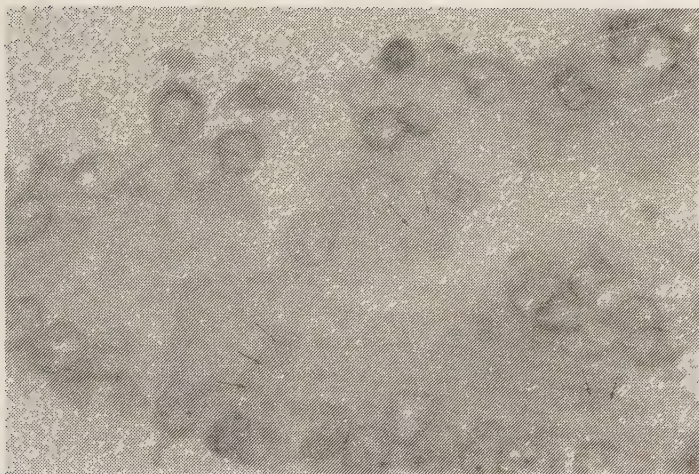


Abb. 10:

Fetale Gallenblase (14. SSW) mit schwach intrazytoplasmatisch gelegener BGP-I-Anfärbung (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

Beim primären hepatozellulären Leberkarzinom färbte sich besonders die Zellmembran der differenzierten Karzinomzellen stark mit A-BGP-I an. Im Gegensatz dazu wiesen noch relativ undifferenzierte Zellen eine zusätzliche, zytoplasmatisch gelegene Anfärbbarkeit auf (S. Abb. 11).

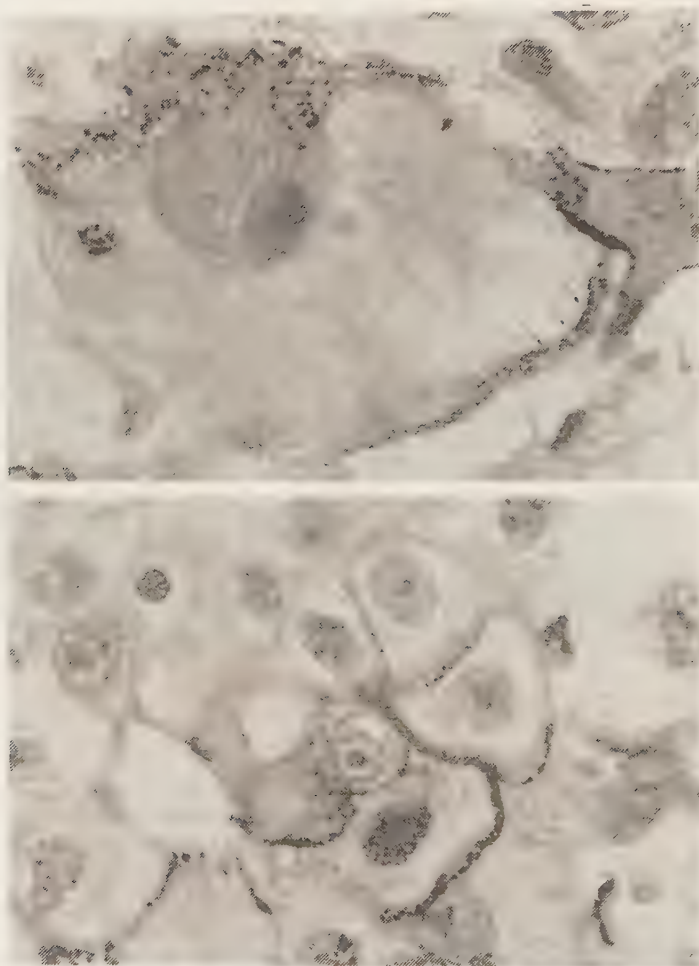


Abb. 11:

- oben:* Eine gut differenzierte Zelle eines hepatozellulären Karzinoms mit zellmembranständiger BGP-I-Aktivität (Pfeile)
- unten:* eine Gruppe z.T. weniger gut differenzierter Zellen des gleichen Malignoms. In einigen zytoplasmatische BGP-I-Anfärbung (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

Das cholangiozelluläre Leberkarzinom zeigte eine starke und diffus zytoplasmatische BGP-I-Färbung. Hierbei waren im Unterschied zum hepatozellulären Karzinom auch die umgebenen Gallenkapillaren des intakten Leberparenchyms stark BGP-I positiv (S. die Abb. 12).

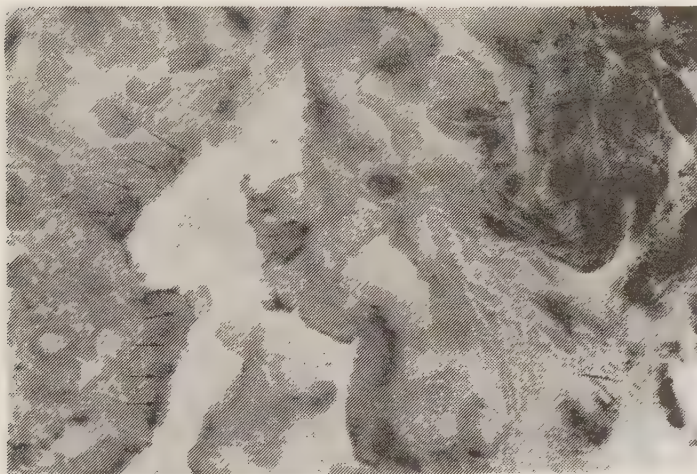


Abb. 12:

Cholangiozelluläres Leberkarzinom mit diffuser zytoplasmatischer BGP-I-Aktivität (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

Vergleichende Färbungen mit A-CEA und A-NCA ergaben für das primäre hepatozelluläre und cholangiozelluläre Leberkarzinom keinerlei Anfärbung.

CALLA zeigte bei Erwachsenen und bei Feten eine diffus zytoplasmatisch gelegene Färbung in den Hepatozyten (Abb. 6).

Bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers, des CA-19-9 zeigte sich nur beim cholangiozellulären Leberkarzinom eine diffus zytoplasmatische Anfärbung. Das hepatozelluläre Malignom war hierfür negativ (Abb. 13).

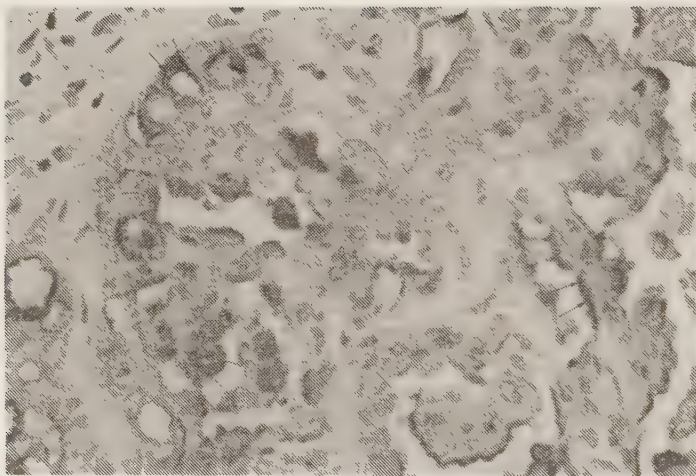


Abb. 13:

CA-19-9 im cholangiozellulären Leberkarzinom vorwiegend zytoplasmatisch und luminal lokalisiert (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

Bei allen Leberveränderungen, wie z.B. dem primären Leberkarzinom, das mit einer reaktiven Bindegewebsvermehrung einhergeht, kommt es auch zu einer starken Prokollagen-III-Vermehrung (S. Abb. 14 für eine maligne Leberveränderung).

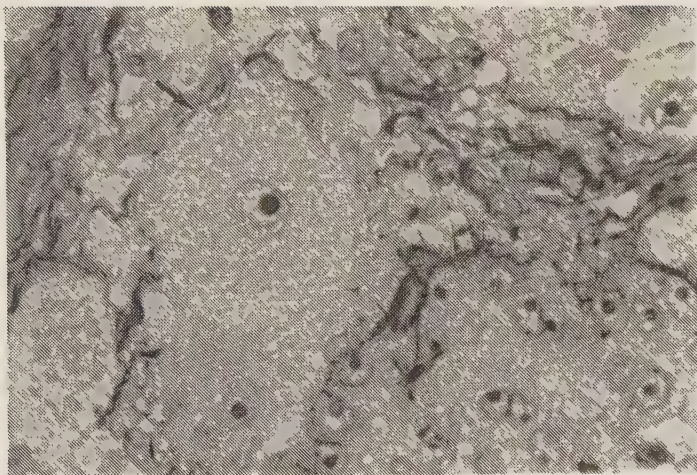


Abb. 14:

N-PP-III-Verteilung in einem hepatozellulären Leberkarzinom.

Faserartige Anordnung zwischen hoch- und z.T. noch undifferenzierten Malignomzellen (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

Wegen der BGP-I-positiven Kanalikuli in der Umgebung von Lebermetastasen colorektaler Karzinome stellte sich die Frage, ob auch Metastasen anderer Malignome zu einem ähnlichen Bild in der Leber führen würden. Zu diesem Zweck wurden die Lebermetastasen der verschiedensten Primärtumoren (Tab. 4 und 5), die entweder selbst BGP-I-positiv waren, oder keine Anfärbung ergaben, untersucht.

Dabei zeigte sich, daß die Gallenkapillaren im Bereich der meisten Metastasen, außer denen eines malignen Melanoms, eines T-lymphoblastischen Lymphoms und eines Nierenzellkarzinoms, unabhängig davon, ob diese selbst für BGP-I positiv waren, anfärbten (S. Abb. 15, 16, 17).

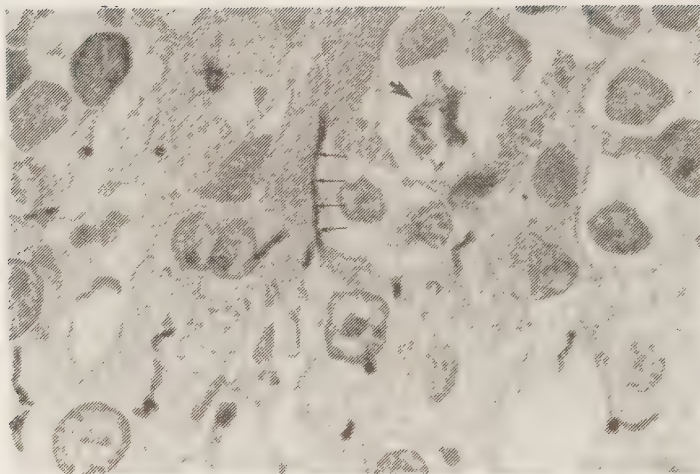


Abb. 15:

BGP-I-positive Gallenkapillaren (Pfeile) in der Umgebung einer Mammakarzinom-Metastase mit Mitose (dicker Pfeil). Die Metastase selbst ist BGP-I-negativ. IOP-Technik; x 1000.

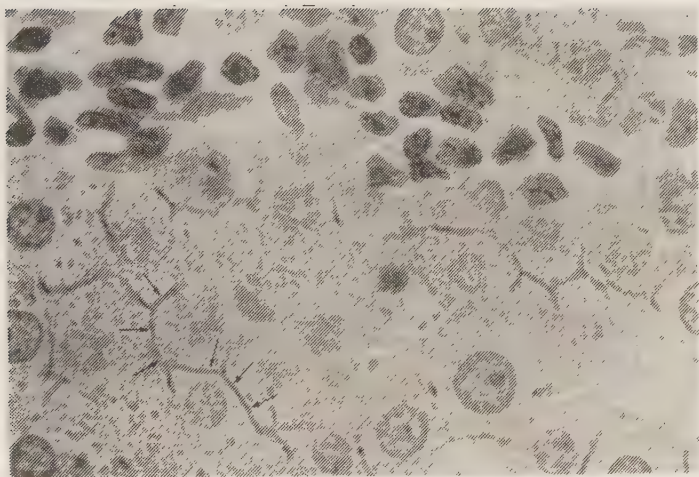


Abb. 16:

Leberinfiltrat eines Non-Hodkin-Lymphoms (CLL), das selbst BGP-I-negativ ist. Besonders im Bereich der Invasionsfront des Malignoms kommt es zu einer deutlichen BGP-I-Darstellung in den Kanalikuli (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

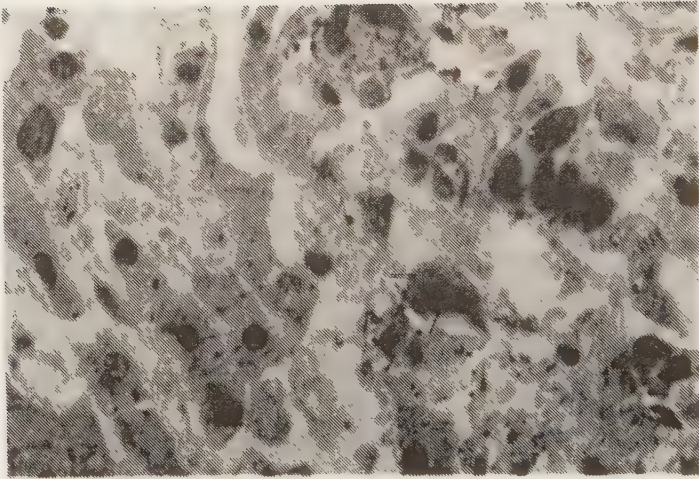


Abb. 17:

Die Lebermetastase dieses Bronchialkarzinoms (Adeno-Ca) ist vorwiegend zytoplasmatisch (Pfeile) BGP-I-positiv. IOP-Technik; x 1000.

In Metastasenlebern unterschiedlicher Primärtumoren kam es zu einer starken reaktiven und immunhistochemisch nachweisbaren Prokollagen-III-Vermehrung (s. Abb. 18) im Gegensatz zu einer normalen Leber des Erwachsenen. Vergleiche hiermit auch die Abb. 8, einer normalen Leber auf ihre N-PP-III-Verteilung hin.

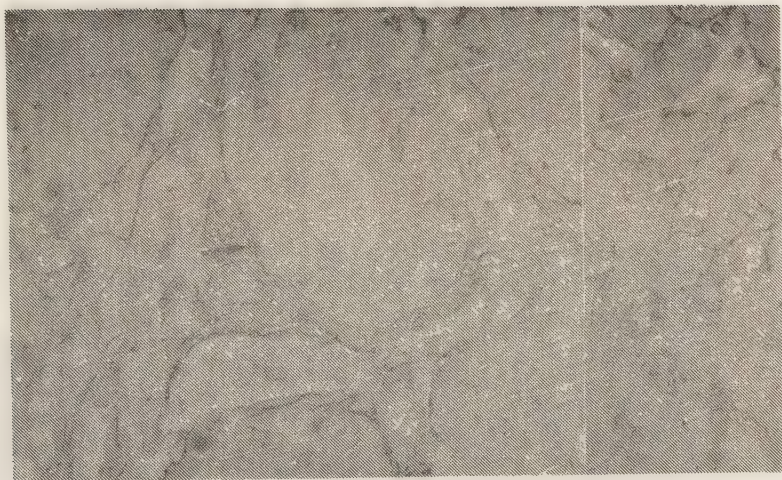


Abb. 18:

- links:* N-PP-III-Verteilung in einer Metastasenleber. Faserartige Anordnung im Bereich der Metastase eines colorektalen Karzinoms Grad 2 (Pfeil),
rechts: raktive N-PP-III-Vermehrung entlang den Sinus in der übrigen Leber, auch in Entfernung von der Metastase (Pfeile). IOP-Technik; x 400.

Da das leberabsorbierte A-BGP-I in der normalen Erwachsenenleber nicht reagierte, sollten nun noch benigne, u.a. entzündliche Lebererkrankungen, untersucht werden.

Bei Fettleber (Grad 1, Abb. 19), Leberzirrhose (Abb. 20), besonders in den Regeneratknoten und bei der Hämochromatose der Leber stellten sich die Gallenkapillaren in unterschiedlicher Stärke BGP-I-positiv dar.

Im Falle eines extrahepatischen Verschlusses der abführenden Gallenwege mit Cholestase der Leber stellten sich die intrahepatischen Gallenkapillaren mit auffallend kräftiger BGP-I-Aktivität dar (S. Abb. 21).

Bei Virushepatitiden mit Bilirubinwerten meist unter 2 mg% korrelierte eine erhöhte BGP-I-Serumaktivität (Bestimmung von Prof. R. Lamerz) und eine histologisch nachweisbare Zunahme der Entzündungsaktivität mit einer zunehmenden BGP-I-Anfärbung meist in den periportalen Kanalikuli (S. Abb. 22).

Noch ausgeprägter war dieses Verhalten bei primär biliären Zirrhosen. Die Fälle hatten fast ausschließlich Bilirubinwerte unter 1 mg% (Tab. 4, S. 72ff). In Frühstadien stellten sich die Kanalikuli meist herdförmig (periportal), in fortgeschrittenen Stadien zunehmend diffus und im zirrhotischen Stadium, besonders in den Regeneratknoten, BGP-I-positiv dar (S. Abb. 23).

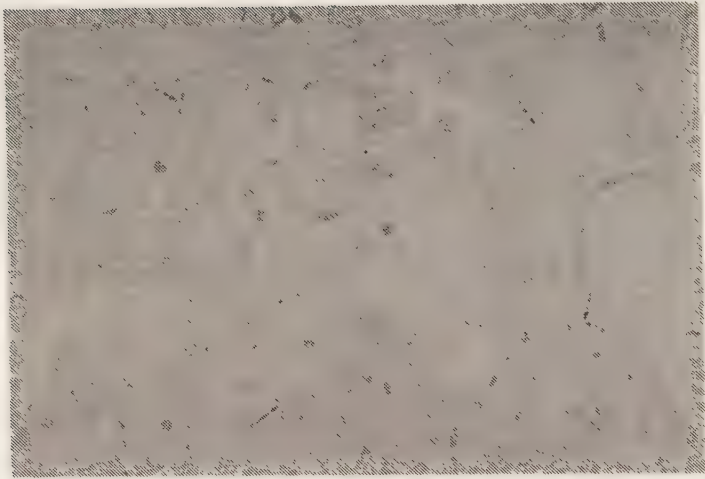


Abb. 19:

Biliäres Glycoprotein in den Kanalikuli (Pfeile) einer Fettleber (Grad 1) des Erwachsenen. IOP-Technik; x 400.



Abb. 20:

BGP-I-Aktivität in den Kanalikuli (Pfeile) einer zirrhotischen Leber des Erwachsenen. IOP-Technik; x 400.

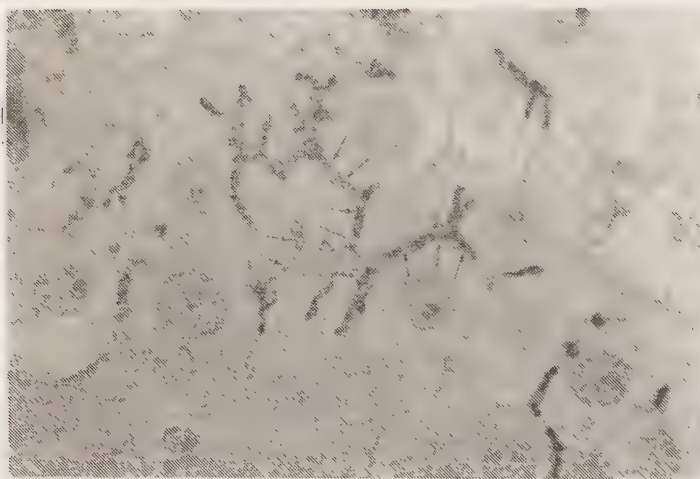


Abb. 21:

BGP-1-Anfärbung in den Kanalikuli (Pfeile) einer adulten cholestatischen Leber bei extrahepatischem Gallengangverschluß durch einen Stein. IOP-Technik; x 1000.

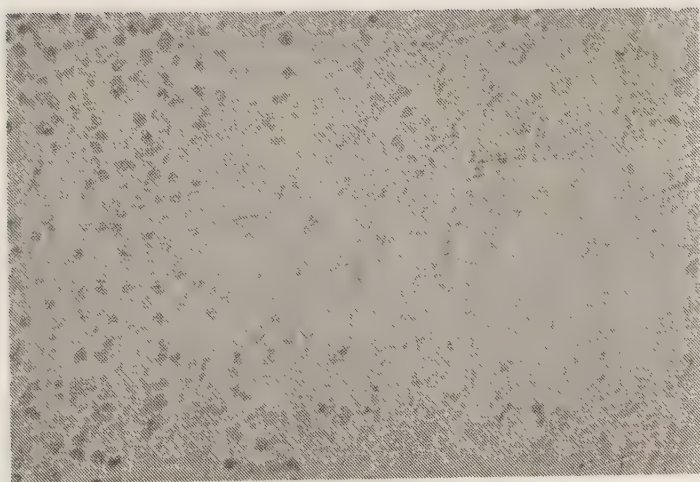


Abb. 22:

BGP-I-Färbung in den periportalen Gallenkapillaren (Pfeile) bei chronisch aggr. Hepatitis. Billirubin 0,9 mg%, Serum-BGP-I 19,6 U/ml (Norm: 14 U/ml). IOP-Technik; x 400.



Abb. 23:

- oben* Intrakanalikulär gelegene BGP-I-Aktivität (Pfeile) bei einer primär biliären Zirrhose, vorwiegend periportal in einem frühen,
- unten:* dagegen diffus im gesamten Läppchen in einem fortgeschrittenen Stadium. IOP-Technik; x 400.

Weder bei benignen Leberveränderungen, noch bei Metastasenlebern, konnte AFP immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Da, wie oben beschrieben, die Lebermetastase eines colorektalen Karzinoms stark mit A-BGP-I anfärbte, wurde der Dickdarm näher untersucht.

Dabei zeigte der normale Darm von Erwachsenen eine schwache, vorwiegend apikal gelegene Anfärbung für das A-BGP-I (alle Präparationen). A-CEA und A-NCA färbten dagegen mit einem vorwiegend zytoplasmatischen Verteilungsmuster (S. Abb. 24).

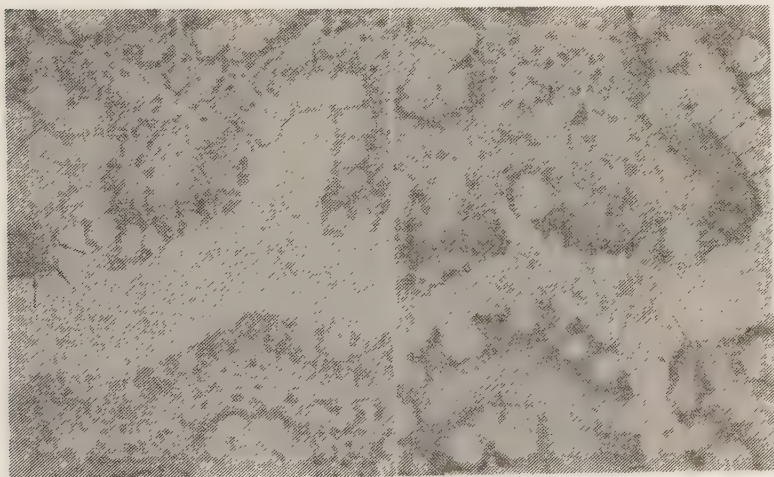


Abb. 24:

links: Normaler Dickdarm des Erwachsenen mit den Lokalisationen von BGP-I vorwiegend apikal-luminal (Pfeile), und
rechts: von CEA stark luminal und schwächer zytoplasmatisch (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

Von fetalem normalen Darm war der Dünndarm inkonstant schwach luminal (ab der 12. Schwangerschaftswoche) für BGP-I und der Dickdarm (ab der 26. SSW) vorwiegend schwach zytoplasmatisch für CEA positiv. Für den fetalen Dickdarm ergab sich keine BGP-I-Anfärbung.

Nun sollte untersucht werden, wie sich das BGP-I bei entzündlichen Dick- und Dünndarmveränderungen darstellen würde.

Bei der Colitis Ulcerosa zeigte sich das Regeneratepithel stark luminal BGP-I- positiv, wogegen sich für CEA keine sichere, für NCA keine Anfärbung ergab (S. Abb. 25).

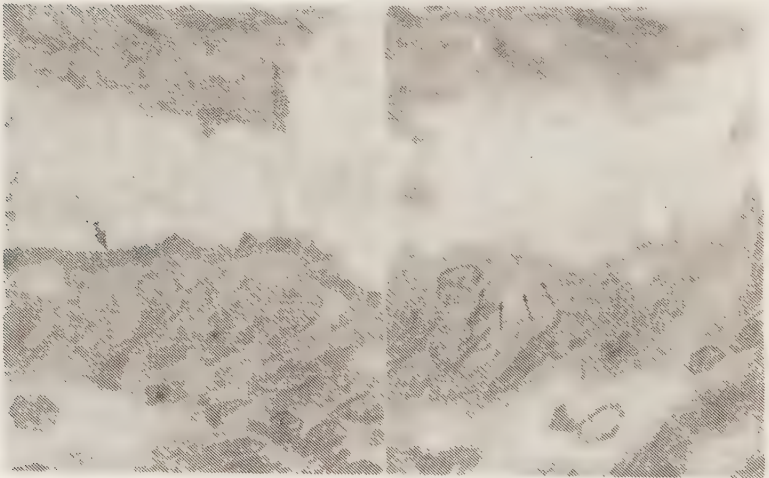


Abb. 25:

- links:* Regeneratepithel einer Colitis Ulcerosa mit den Verteilungen für BGP-I, vorwiegend luminal (Pfeil), und
rechts: CEA, nicht sicher zytoplasmatisch nachweisbar (Pfeile). IOP-Technik, x 1000.

Der Morbus Crohn des Dünndarms war für BGP-I, CEA und NCA negativ.

Bei Crohn-Befall des Dickdarms stellten sich das BGP-I und CEA inkonstant luminal, das CEA und NCA inkonstant zytoplasmatisch dar.

Von den benignen Dickdarmveränderungen wurden noch die Dickdarmadenome unterschiedlicher Atypiegrade auf die Verteilung von BGP-I untersucht. Dabei zeigte sich, daß die luminal Anfärbung für BGP-I mit zunehmender Atypie immer stärker wurde, während hierbei die Aktivität besonders für CEA, weniger für NCA, zunehmend geringer wurde.

Im Gegensatz dazu nahm mit steigender Atypie der Adenome die zytoplasmatische Anfärbbarkeit für CEA, weniger für NCA, stetig zu (S. Tab. 4, S. 72ff).

In Dickdarmkarzinomen (S. Tab. 4, S. 72ff) hing die Lokalisation von BGP-I, wie auch zum Teil von CEA und NCA ganz vom jeweiligen Differenzierungsgrad des Malignoms ab; Je geringer das colorektale Karzinom differenziert war, desto mehr glich die Verteilung des BGP-I der diffus zytoplasmatischen Lokalisation von CEA. BGP-I färbte aber auch hier mit einer kräftigen, luminal gelegenen Bande (Abb. 26).

Bei hochdifferenzierten Dickdarmkarzinomen (Grad 1) trat die unterschiedliche Verteilung von BGP-I und seinen kreuzreagierenden Antigenen besonders deutlich hervor. Während das BGP-I bei Grad-1-Karzinomen ausschließlich in einer starken, luminal gelegenen Bande färbte, trat CEA deutlich diffus zytoplasmatisch mit einer zusätzlichen schwachen, luminalen Anfärbung auf (Abb. 27).

NCA zeigte hierbei eine schwach zytoplasmatisch und luminal gelegene Aktivität.

In den meisten untersuchten Dickdarmkarzinomen glich die NCA-Färbung einer schwach ausgeprägten CEA-Aktivität (S. Abb. 27).

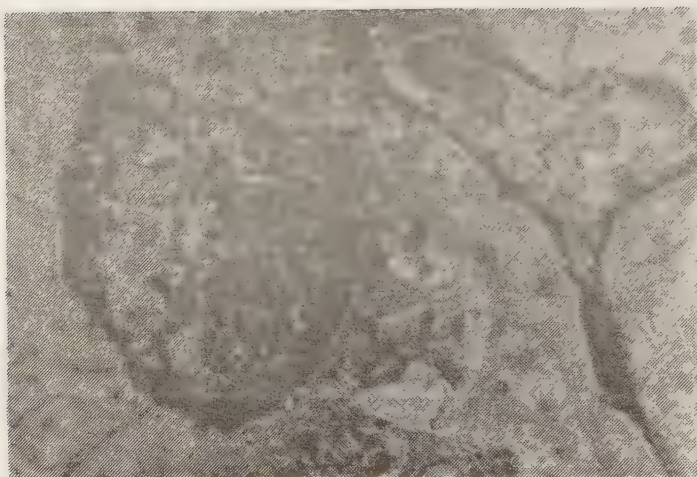


Abb. 26:

Gering differenziertes Dickdarm-Ca.

BGP-I diffus zytoplasmatisch in linker Zellgruppe (Pfeile), zusätzlich luminales Verteilungsmuster rechts (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

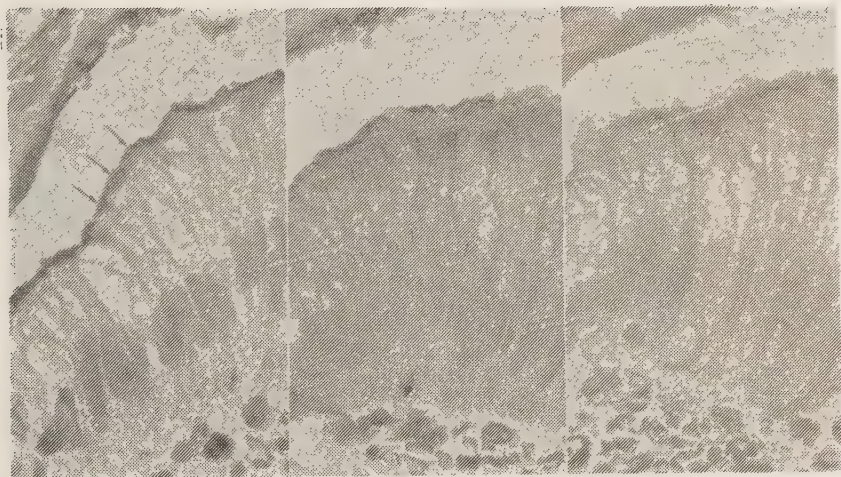


Abb. 27:

Hochdifferenziertes Dickdarm-Ca

- links:* Histologisches Verteilungsmuster von BGP-I: luminal
mitte: CEA: luminal und zytoplasmatisch
rechts: NCA: schwach luminal und zytoplasmatisch. IOP-Technik; x 1000.

Von den Organen des oberen Verdauungstraktes wurde der Magen eingehender untersucht.

Im normalen Magen war sowohl der Korpus- als auch Antrumbereich für BGP-I, CEA und NCA negativ.

Auch sämtliche untersuchten Magenkarzinome (S. Tab. 4, S. 72ff) waren für BGP-I und NCA negativ. Siegelringzellkarzinome und differenzierte Adenokarzinome vom intestinalen Typ waren dagegen CEA-positiv (S. Abb. 28).

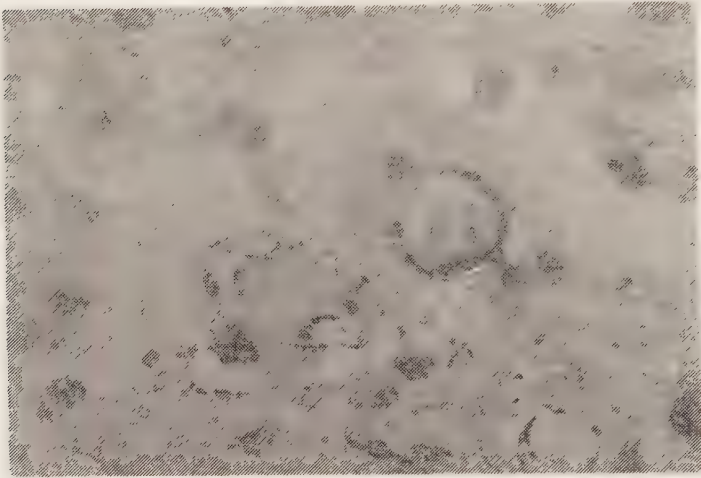


Abb. 28:

CEA, diffus zytoplasmatisch (Pfeile) in den Siegelringzellen eines Magenkarzinoms. IOP-Technik; x 1000.

Nach den bisherigen Untersuchungen zeigte sich das BGP-I als ein nicht ausschließlich auf die Leber beschränktes Antigen, sondern konnte auch im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Befunde stellte sich die Frage, ob sich das BGP-I auch in Organen außerhalb des Verdauungstraktes finden lassen könnte. Zu diesem Zweck wurden die verschiedensten extraintestinal gelegenen fetalen und adulten Organe untersucht (S. Tab. 4, S. 72ff).

Die normale fetale und adulte Lunge war in den Granulozyten, Makrophagen und im Alveolarepithel nur für NCA positiv (s. histologische Abb. Tab. 2, Kap. II, S. 30).

Dysplastisches Bronchialepithel zeigte eine zytoplasmatische BGP-I- Aktivität (S. Abb. 29). Dies war für CEA und NCA nicht der Fall.

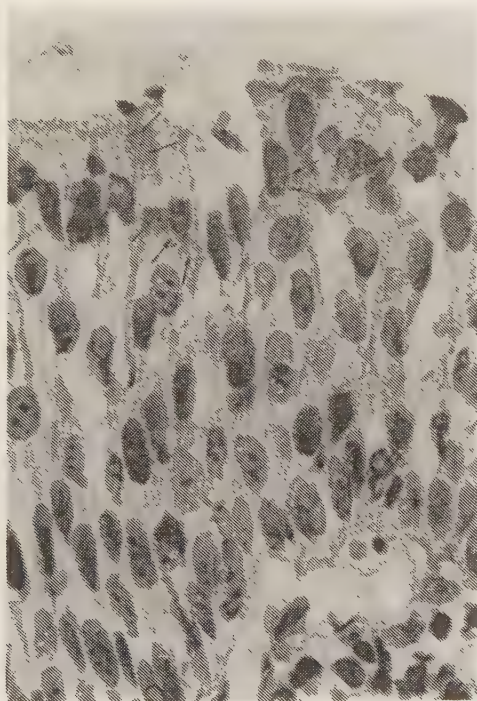


Abb. 29:

Schwache, zytopl. BGP-I Darstellung (Pfeile) in dysplastischer Bronchialschleimhaut. CEA und NCA waren hier negativ. IOP-Technik; x 1000.

Von den Bronchialkarzinomen waren die Plattenepithelkarzinome im stark metaplastischen Horn deutlich für BGP-I und CEA positiv. NCA war hier negativ (S. Abb. 30).

Dagegen zeigten die Hornlamellen der normalen Haut, ein Plattenepithelkarzinom derselben und auch die Hornlamellen eines Cholesteatoms keinerlei Anfärbung für BGP-I, CEA und NCA.

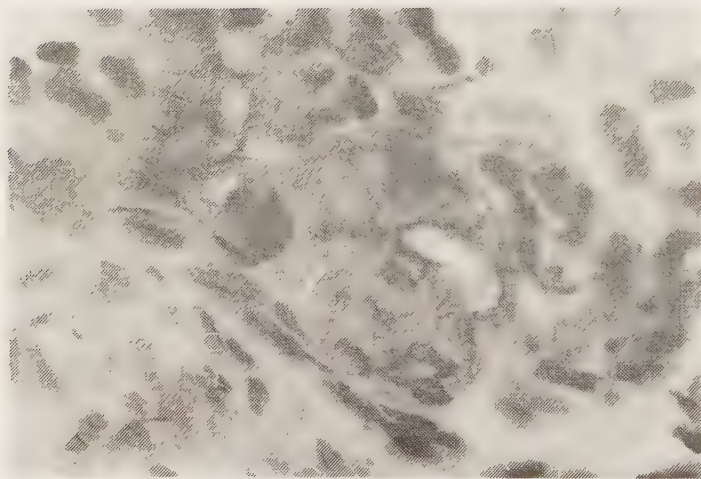


Abb. 30:

BGP-I in differenzierten Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Lunge. IOP-Technik; x 1000.

An ein Bronchialkarzinom angrenzendes, schwer dysplastisches Bronchialepithel war ebenfalls nur für BGP-I positiv. Adenokarzinome des Bronchus waren für die o.g. Antigene negativ. Im Gegensatz dazu zeigte die Lebermetastase dieses Malignoms eine diffus zytoplasmatisch gelegene BGP-I-Aktivität. Gallenkapillaren in unmittelbarer Nähe des Tumors stellten sich sehr schwach für BGP-I positiv dar (S. Abb. 17).

Bei der normalen Schilddrüse des Erwachsenen (Abb. 31) waren das Kolloid und die Follikelepithelien, beim Schilddrüsenkarzinom nur der medulläre Typ und hier die Tumorzellen diff. zytoplasmatisch CEA-positiv (Abb. 32).

Für BGP-I konnte in der normalen Schilddrüse keine, bei medullären und anderen Schilddrüsenkarzinomen keine eindeutige Anfärbung festgestellt werden (S. Abb. 31 und 32). NCA war in der Schilddrüse nicht nachzuweisen.

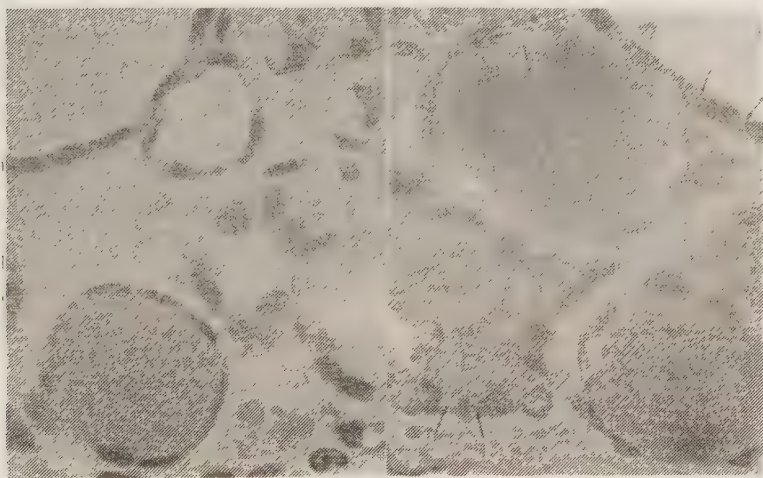


Abb. 31:

links: Normale Schilddrüse des Erwachsenen, negativ für BGP-I,
rechts: Kolloid und Follikelepithelien CEA-positiv (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

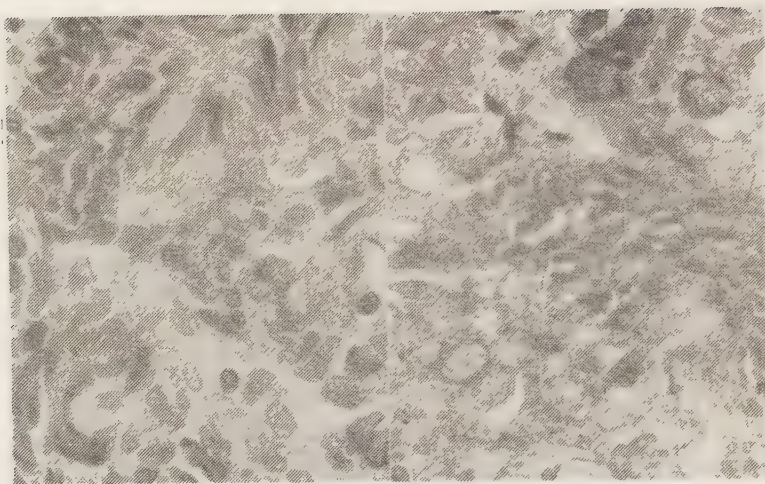


Abb. 32:

links: Medulläres Schilddrüsenkarzinom des Erwachsenen. Fraglich positiver BGP-I-Nachweis,

rechts: diff. zytopl. CEA-Anfärbung in den Tumorzellen (Pfeile). IOP-Technik; x 1000.

Bei den unterschiedlichen Karzinomen, sowie in der normalen Mamma, konnte nur für das CEA, wenn auch inkonstant eine Aktivität in ductalen Strukturen gefunden werden.

Von den Organen des männlichen Urogenitaltraktes waren Hoden, Prostata und Blase sowie deren Malignome für BGP-I, CEA und NCA negativ.

Auch im normalen Ovar erfolgte für die o.g. Antigene keine Reaktion. Dagegen stellte sich das Ovarialkarzinom vom Adeno-Typ für CEA diffus zytoplasmatisch dar. NCA konnte im Mucin eines Ovarialkystoms nachgewiesen werden.

Für das BGP-I zeigte sich im weiblichen Genitaltrakt nur bei Graviden eine starke, apikal bis luminal gelegene Anfärbung der Endometrialdrüsen (S. Abb. 33).

Ebenfalls nur bei Gravidität waren Drüsenepithelien und Deziduazellen des Endometriums schwach AFP-positiv.

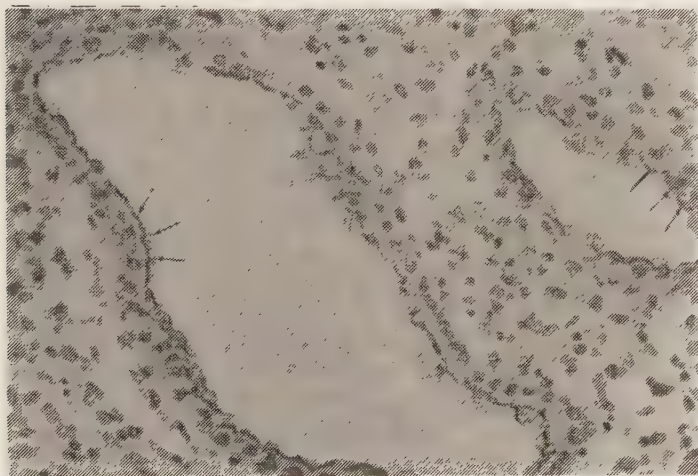


Abb. 33

BGP-I, vorwiegend apikal (Pfeile) im Epithel von Endometrialdrüsen bei einer Frühgravidität (Abraçat). IOP-Technik; x 1000.

Das Epithel im männlichen und weiblichen Urogenitaltrakt war für BGP-I, CEA und NCA negativ.

Zur Vervollständigung der Systematik in der vorliegenden Arbeit wurden noch die verschiedensten fetalen Gewebe, und adulten, sowohl benigne als auch maligne veränderten Organe auf BGP-I und seine kreuzreagierenden Antigene, und teilweise auch auf das Vorkommen von AFP, N-PP-III, CALLA und CA-19-9 untersucht (S. Tab. 4 und 5, S. 72ff und S. 82ff).

Tab. 4: Aufstellung aller fetalen und adulten benignen sowie adulten maligne veränderten Organe, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden

Fetalorgane 11-37 Schwangerschaftswoche (SSW)

Organ (N)	SSW	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Leber (7)	12 - 36	Gallenkapillare	+++	+	+
	12 - 36	größere Gallengänge	-	-	-
Gallenblase (3)	14 - 16	zytoplasmatisch	(+)	-	-
Dünndarm (3)	12 - 16	luminal inkonstant	(+)2/3	-	-
Magen: Corpus (2)	12, 24		-	-	-
Antrum (2)	12, 24		-	-	-
Dickdarm (13)	12 - 37	zytoplasmatisch und in Becherzellen	-	+ ab 26 SSW	-
Ösophagus	14	zytoplasmatisch	-	+	-
Pankreas (3)	12,16,24		-	-	-
Milz (4)	12 - 30	Granulozyten	-	-	+
Niere/Nebenn. (5)	12 - 30		-	-	-
Schilddrüse (2)	12, 24		-	-	-
Thymus (4)	12 - 32		-	-	-
Lunge (3)	12,16,24	Granulozyten Makrophagen	-	-	+
Herzmuskel	12, 24		-	-	-
Rückenmark (thorakal) (2)	12, 16		-	-	-
Knorpelgewebe (4)	12 - 21		-	-	-

Fortsetzung Tab. 4

Fetalorgane 11-37 Schwangerschaftswoche (SSW)

Organ (N)	SSW	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Hoden/Prostata(2)	12, 30		-	-	-
Plazentagewebe(6)	12 - 28		-	-	-
Uterus/Adnexe (2)	14, 26		-	-	-
Tube (5)	14 - 30		-	-	-
Ovar (5)	14 - 30		-	-	-

Fortsetzung Tab. 4

Erwachsenenorgane (benigne - entzündlich)

Organ	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Leber (7)	Gallenkapillare	-	-	-
	Granulozyten	-	-	+
Leberzirrhose (3)	Gallenkapillare	++	-	-
Leber: Cholestase (Steinversch. (3)	Gallenkapillare	++	-	-
Primär biliäre Zirrhose (PBZ)				
(Bili < 1, ein Wert 7,6)				
- Frühstadium (5)	Gallenkapillare herdf.	+	-	-
- Fortgeschr. Stadium (7)	Gallenkapillare diffus	++	-	-
- Zirrh. Stad. der PBZ (4)	Gallenkapillare herdf.	++	-	-
Akute Virushepatitis	Gallenkapillare peri-	+	-	-
(Bili* 1,5/Serum-BGP** 3,1)	portal			
Chron. pers. Virushepatitis	Gallenkapillare	+	-	-
(Bili 0,7/Serum-BGP 3,3)				
Chron. pers. Hepatitis (2)	Gallenkapillare peri-	+	-	-
(Bili 0,65;0,9/Serum-BGP	portal			
6,3;8,1				
Chron. agres. Hepatitis	Gallenkapillare teil-	+++	-	-
(Bili 0,9/Serum-BGP 19,6)	weise			
Chron. flor. Virushepatitis	Gallenkapillare teil-	+++	-	-
(Bili 6,6/Serum-BGP 26,5)	weise			
Chron. flor. Hepatitis	Gallenkapillare peri-	++	-	-
(Serum-BGP 14)	portal			
Hämochromatose (2)				
Bili 0,91/Serum-BGP 6,19		++	-	-
Bili 1,10/Serum-BGP 11,20				
Hämochromatose + Zirrhose	Gallenkapillare teil-	++	-	-
(Serum-BGP 49)	weise			
Fettleber Grad 1	Gallenkapillare teil-	++	-	-
(Bili 1,2/Serum-BGP 7,8)	weise			
Ductus Choledochus (2)		-	-	-
Gallenblase (3)	luminal/zytoplasmatisch	-	+	-
Milz (3)	Granulozyten	-	-	+++
Pankreas (3)	Epithel der Gänge: zyto-	-	-	++
	plasmatisch			

*) Bilirubin Norm: bis 1mg%

**) BGP Norm: bis 14 U/l

Fortsetzung Tab. 4

Erwachsenenorgane (benigne - entzündlich)

Organ	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Niere (4)		-	-	-
Nebenniere (3)		-	-	-
Blase (2)		-	-	-
Appendix (2)	luminal zytoplasmatisch	++ -	(+) +++	- +
Colon (5)	luminal zytoplasmatisch	+ (+)	++ +++	+ink. ++
Colitis ulcerosa (14)	Epithel luminal zytoplasmatisch	+++ (+)	+ ++	+ ++
	Regeneratepithel luminal zytoplasmatisch	+++ -	(+) +	(+) -
Morbus Crohn (11)	Dünndarm: Epith. luminal zytoplasmatisch	(+) (+)	(+) (+)	(+) (+)
Morbus Crohn (3)	Dickdarm: Epith. luminal zytoplasmatisch	+2/3 -	+1/3 +++1/3	- +1/3
Strahlenstenose Colon	Epithel zytoplasmatisch	-	+	-
Magen - Korpus (2)		-	-	-
- Antrum (2)		-	-	-
Dünndarm (4)	zytoplasmatisch	-	+2/4	-
Ösophagus (2)	luminal zytoplasmatisch	- (+)	- ++	- -
Haut Plattenepithel (7)(Horn)		-	+3/7	-
Haut Schweißdrüsengang (2)		-	++	-
Haut Nervengewebe (2)		-	-	-
Lipom (2)		-	-	-
Schilddrüse (2)	Kolloid Follikel epithel	- -	+++ ++	- -
Rückenmark (thorakal) (2)		-	-	-

Fortsetzung Tab. 4

Erwachsenenorgane (benigne - entzündlich)

Organ	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Thymus-Fettkörper (2)		-	-	-
Knochenmark (3)	Granulozyten	-	-	+
Herzmuskel (2)	Granulozyten	-	-	+
Lunge (3)	Granulozyten/Makrophagen	-	-	+++
Bronchialschleimhaut (3)		-	-	-
Brustdrüse (4)	Drüsenläppchen diffus	-	+2/4	-
Hoden (4)		-	-	-
Prostata (4)		-	-	-
Eierstock (5), 18-42 Jahre		-	-	-
Corpus Luteum Zyste (2)		-	-	-
Tuben (5), 18-42 Jahre		-	-	-
Adnexe (3), 18-42 Jahre		-	-	-
Mamma (3), 40-60 Jahre	Epithel der Gänge, zytoplasmatisch	-	+	-
Endometrium, 18-44 Jahre Endometrialdrüsen:				
- in der Schwangerschaft (6)	luminal	++	-	-
- Sekretionsphase (2)		-	-	-
- Proliferationsphase (3)		-	-	-
- Regenerationsphase (3)		-	-	-

Fortsetzung Tab. 4

Erwachsenenorgane (maligne verändert - Metastasen)

Organ	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Leber-Ca, hepatozell. (6)	diff. Zellen Membran	+++	-	-
Leber-Ca, cholangiozell. (7)	Ca diffus umgebende Gallenkapill.	++ ++	- -	- -
Colon-Ca Diff. Grad 1 (5)	luminal zytopl. Nekrose	+++ (+) ++	+ +++ ++	+ ++ ++
Diff. Grad 2 (20)	luminal zytopl. Nekrose	++ (+) +	++ +++ ++	+ ++ +++
Diff. Grad 3 (10)	luminal zytopl. Nekrose	+++ (+) ++	+ +++ ++	+ ++ +++
- Lebermetastase (3)				
Diff. Grad 1-2		++	+++	+++
	Nekrose umgebende Gallenk.	++ ++	+++ -	+++ -
Adenom, tubulovillös (3)	luminal zytopl.	+ -	+ +++	+ ++
Polyp, Hyperpl. keine Atypie (2)	luminal zytopl.	++ -	+++ ++	+ -
Tubuläres Adenom geringe Atypie (3)	luminal zytopl.	++ -	+++ +++	+ ++
Tubuläres Adenom mittelgradige Atypie (3)	luminal zytopl.	+++ (+)	++ +++	++ ++
Tubuläres Adenom schwere Atypie (3)	luminal zytopl.	+++ (+)	+ +++	++ ++
Dünndarm-Ca (2)	luminal zytopl.	+ -	++ ++	+++ ++
Pankreas-Ca				
- ductales-Ca (3)	Pank. Gänge zytopl.	-	-	+
- Adeno-Ca (3)	Pank. Gänge zytopl.	-	-	+
- Lebermetastase (je 2)	umgeb. Gallenkapill.	+	-	-

Fortsetzung Tab. 4

Erwachsenenorgane (maligne verändert - Metastasen)

Organ	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Malig. Melanom (4)		-	-	-
- Lebermetastase (2)	umgeb. Gallenkapill.	-	-	-
Nierenzell-Ca (3)		-	-	-
- Lebermetastase (2)	umgeb. Gallenkapill.	-	-	-
Non-Hodkin-Lymphom (2) = CLL		-	-	-
- Lebermetastase (2)	umgeb. Gallenkapill.	++	-	-
Mamma-Ca, ductal (3)	Läppchen diffus	-	+1/3	-
- Lebermetastase, ductal (2)	diffus	-	+	-
	umgeb. Gallenkapill.	++	-	-
Mamma-Ca, szirrhöser Typ (2)		-	-	-
Mamma-Ca, medullär		-	-	-
Magen-Ca, Siegelringtyp (4)	Siegelringzellen	-	+2/4	-
Magen-Ca, intest. Typ	zytopl.	-	++2/5	-
- hochdiff. (5)				
Magen-Ca, intest. Typ				
mäßig diff. (3)		-	-	-
- Lebermetastase (2)	umgeb. Gallenkapill.	++	-	-
Ösophagus-Ca, Platten-	metapl. Plattenepithel	+	+++	-
epithel (2)				
- Lebermetastase	metapl. Plattenepithel	+	+++	-
	umgeb. Gallenkapill.	++	-	-
Undiff. embryonales Teratom		-	-	-
- Lebermetastase	umgeb. Gallenkapill.	++	-	-
Plasmozytom, Knochen (2)	IgA Kappa Typ	-	-	-
- Lebermetastase (2)	IgA Kappa Typ umgeb.	++	-	-
	Gallenkapill.			
T-Lymphoplastisches				
Lymphom (2)		-	-	-
- Lebermetastase (2)	umgeb. Gallenkapill.	-	-	-

Fortsetzung Tab. 4

Erwachsenenorgane (maligne verändert - Metastasen)

Organ	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Ovarial-Ca, Adeno-Ca mäßig diff.	diffus	(+)	++	-
- Lebermetastase (2)	diffus	(+)	++	-
	umgeb. Gallenkapill.	+	-	-
Urothel-Ca (4)		-	-	-
- Lebermetastase (2)	umgeb. Gallenkapill.	++	-	-
Bronchial-Ca, Adeno-Ca (2)		-	-	-
- Lebermetastase,	Tumor diffus zytopl.	+	-	-
	umgeb. Gallenkapill.	+	-	-
Bronchial-Ca, Platt. (5)	zytopl.	++	+++	-
	angrenz. schw. Dyspl.	+	-	-
Bronchial-Ca, kleinz. (3)		-	-	-
Bronchial-Ca, großzell. (2)		-	-	-
Cholesteatom (3)	Hornlamellen	-	-	-
Schilddrüsen-Ca:				
- medullär (2)	Spindelzellen	(+)	+++	-
- follikulär (2)		-	-	-
- papillär (2)		-	-	-
Parotis-Ca (2)		-	-	-
Kehlkopf-Ca (2)	Normales Epithel zytopl.	(+)	+++	(+)
	Ca: Epithel	-	(+)	-
Haut, Plattenepithel-Ca (4)		-	-	-
Gallenblasen-Ca (3)	Epithel luminal	(+)	+	-
	zytopl.	-	+	-
Prostata-Ca (2)	Epithel luminal	-	-	+
Hoden-Ca, Teratom (2)		-	-	-
Seminom (2)		-	-	-

Fortsetzung Tab. 4

Erwachsenenorgane (maligne verändert - Metastasen)

Organ	Lokalisation	BGP	CEA	NCA
Uterus-Ca (2)	Endometrialdrüsen:			
	- luminal	+	-	-
	- Ca: diffus	-	++	-
	- Nekrosen	(+)	++	(+)
Mucinöses Ovarialkystom mit Adeno-Ca	Mucin	-	-	+
	Ca: zytopl.	-	+	-

Eine Übersicht der Lokalisation mituntersuchter Antigene wie AFP, N-PP-III, CALLA und CA-19-9 siehe in der tabellarischen Zusammenfassung Seite 82ff.

Nach der tabellarischen Aufzählung aller Gewebe, die überhaupt in dieser Studie untersucht wurden, soll nun zum Überblick eine tabellarische Zusammenfassung aller in dieser Studie verwendeten Antigene auf die unterschiedliche Lokalisation hin gegeben werden.

Dabei läßt sich das BGP-I, als wichtigstes und vor allem interessierendes Antigen dieser Untersuchung, schon auf Grund seiner Lokalisation und der entsprechenden Ausprägung von seinen kreuzreagierenden Antigenen (CEA und NCA) und den anderen, in dieser Studie mituntersuchten Antigenen (AFP, N-PP-III, CALLA, und CA-19-9) abgrenzen (S. Tab. 5).

Tab. 5: ZUSAMMENFASSUNG DER LOCALISATIONEN VOM BGP-I, CEA, MCA, AFP, M-PP-II, CALLA UND CA-19-9

IM MENSCHLICHEN GEWEBEN

Gewebe (N)	Reaktionsort und Typ	BGP	CEA	MCA	AFP	M-PP-II	CALLA	CA-19-9
<u>Fetale Organe (benigne):</u>								
Leber (7), 12-36 SSW*	Gallenkapill.	+++	-	-	-	-	-	-
	Hepatozyten zytopl.	-	-	-	++	-	++	-
	um die Hepatozyten	-	-	-	-	++	-	-
	größere Galleng.	-	-	-	-	-	-	-
Gallenblase (3)	Epith. zytopl.	+	-	-	++	-	-	-
Dünndarm (3)	Epithel lum. inkonst.	+2/3	-	-	-	0	-	0
Dickdarm (13)	Epithel zytopl.	-	+ ab	-	-	0	-	0
	einschl. Becherzellen	-	126 SSW	-	-	-	-	-
Ösophagus (2)	Epith. zytopl.	-	+	-	0	0	0	0
Lunge (3)	Granulozyten	-	-	++	-	0	-	0
	Makrophagen	-	-	++	-	0	-	0

* SSW = Schwangerschaftswoche

Fortsetzung Tab. 5

ZUSAMMENFASSUNG DER LOKALISATIONEN VON BGP-I, CEA, MCA, AFP, N-PP-III CALLA UND CA-19-9

IN MENSCHLICHEN GEWEBEN

Gewebe (N)	Reaktionsort und Typ	BGP	CEA	MCA	AFP	N-PP-II	CALLA	CA-19-9
<u>Adulte Organe (benigne - entzündlich - maligne):</u>								
Leber (7)	Gallenkapill. um die Hepatozyten Hepatozyten zytopl.	- - -	- - -	- - -	- - -	- + -	- - ++	- - -
Leber:								
- extrahep. Cholestase (3)	Gallenkapill.	+++	-	-	-	-	-	-
- Hepatitis (8)	Gallenkapill.	++	-	-	-	-	-	-
- Primär biliäre Zirrhose (15)	Gallenkapill.	++	-	-	-	-	-	-
Primäres Leberkarzinom:								
- hepatocellulär (6)	diff. Zellen (Membran)	++	-	-	-	-	-	-
- cholangiozellulär (7)	diff. Zellen (zytopl.)	++	-	-	-	-	-	++
	umgeb. Gallenkapill.	++	-	-	-	-	-	-

0 = nicht mituntersucht

ZUSAMMENFASSUNG DER LOCALISATIONEN VON BGP-I, CEA, NCA, AFP, N-PP-III CALLA UND CA-19-9

IN MENSCHLICHEN GEWEBEN

Gewebe (N)	Reaktionsort und Typ	BGP	CEA	NCA	AFP	N-PP-III	CALLA	CA-19-9
Adulte Organe								
Lebermetastasen:								
1. Bronchial-Ca, Adeno-Ca (2)	zytopl. umgeb. Gallenkapill.	++ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -
2. a) Colorectales-Ca Grad 1-2 (3)								
b) Ösophagus-Ca, Plattenepithel-Ca (2)	zytopl. (a,b, umgeb. Gallenkapill. (a,b)	++ ++	+++ -	(+) -	- 0 0	- 0 0	- -	0 0 0
3. a) Mamma-Ca, ductales-Ca (2) b) Ovarial-Ca, Adeno-Ca (2) c) Magen-Ca: Siegelringtyp (2) Intest.-Typ (2)								
	zytopl. (a,b,c) umgeb. Gallenkapill. (a,b,c)	- ++/b+	++ -	- -	- 0 0	- 0 0	- -	0 0 0
4. Pankreas-Ca, ductales-Ca (2) Adeno-Ca (2)	Gänge zytopl. umgeb. Gallenkapill.	- +	- -	++ -	- 0 0	- 0 0	- -	++ -
5. a) Non-Hodkin-Lymphom (2), b) Plasmosyom (2), c) Undiff. embryon. Teratom d) Urothel-Ca (3)	umgeb. Gallenkapill. (a,b,c,d)	++	-	-	-	0	-	0
Gallenblase (3)	zytopl.	-	+	-	-	0	-	-
Gallenblasen-Ca (3)	zytopl.	-	++	-	-	0	-	-

0 = nicht mituntersucht

ZUSAMMENFASSUNG DER LOKALISATIONEN VON BGP-I, CEA, MCA, APP, N-PP-II CALLA UND CA-19-9

IM MENSCHLICHEN GEWEBEN

Gewebe (N)	Reaktionsort und Typ	BGP	CEA	MCA	APP	N-PP-II	CALLA	CA-19-9
Adulte Organe								
Dünndarm (4)	zytopl. inkonst.	-	+2/4	-	-	0	0	0
Dünndarm-Ca (2),	Epithel luminal zytopl.	+	++	++	0	0	0	0
Dickdarm (5)	Epithel luminal zytopl.	+	++	(+)	-	0	-	0
Colitis ulcerosa (14)	Epithel luminal zytopl.	+++	+	+	0	0	0	0
	Regeneratorepithel luminal zytopl.	++	(+)	(+)	0	0	0	0
		+1/3	+1/3	-	0	0	0	0
Morbus Crohn (3, Colon)	Epithel luminal zytopl.	+	+	-	0	0	0	0
		-	+++1/3	+1/3	0	0	0	0
Morbus Crohn (11, Duodenum)	Epithel luminal zytopl.	(+)	(+)	(+)	0	0	0	0
		(+)	(+)	(+)	0	0	0	0
Colorectale Adenome (14)	Epithel luminal zytopl.	+++	++	++	0	0	0	0
		+++	+++	++	0	0	0	0
Colorectale Karzinome (35)	Epithel luminal zytopl.	+++	++	+	0	0	0	0
		(+)	+++	++	0	0	0	0
Magenkarzinom:								
- Siegelringzelltyp (4)	Siegelringzellen	-	++2/4	-	0	0	0	0
- intestinaler Typ (8)	zytopl.	-	++4/8	-	0	0	0	0
Bronchialschleimhaut (3)	zytopl.	+	-	-	0	0	0	0
- Dysplasie (3)		++	+++	-	-	0	-	0
- Plattenepithel-Ca (5)	zytopl.	-	-	-	-	0	-	0
- großzell.-Ca (2)		-	-	-	-	0	-	0
- kleinzell.-Ca (3)		-	-	-	-	0	-	0

0 = nicht mituntersucht

Fortsetzung Tab. 5

ZUSAMMENFASSUNG DER LOKALISATIONEN VON BGP-I, CEA, MCA, APP, M-PP-III, CALLA UND CA-19-9

IN MENSCHLICHEN GEWEBEN

Gewebe (N)	Reaktionort und Typ	BGP	CEA	MCA	APP	M-PP-II	CALLA	CA-19-9
Adulte Organe								
Haut (7), Plattenepithel-Ca (4) Schweißdrüsenang (2)	Hornschicht	-	-	-	-	0	-	0
		-	++	-	-	0	-	0
Cholesteatom (3)	Hornlamellen	-	-	-	0	0	0	0
Schilddrüse (2)	Kolloid	-	++	-	0	0	0	0
	Follikel-epithelien	-	++	-	0	0	0	0
Schilddrüsen-Ca, medull. Typ (2)	Spindelzellen zytopl	(+)	+++	-	0	0	0	0
Endometrium (8)	Drüsen lum.	-	-	-	0	0	0	0
- in der Schwangerschaft	zytopl.	++	-	-	0	0	-	0
		-	-	-	++	0	-	0
Endometrium Ca (2)	Drüsen lum.	+1/2	-	-	0	0	-	0
	zytopl.	-	-	-	+	0	-	0

(0 = nicht mituntersucht)

Tabelle 6:

Übersicht der histologischen Abbildungen aussagekräftiger Beispiele immunhistochemisch untersuchter Gewebe

Abb. Tabelle 2:	Gewebe:	Antigen-Darstellung
	Fetale Leber	BGP-I*
	Adultes Colon	CEA
	Adulte Milz, Lunge, Pankreas, Knochenmark	NCA

Abb. Nr.:	Gewebe: intestinal	Antigen-Darstellung
3	adulte Leber	BGP-I (nicht leberabs.)
4	Lebermetastase: Colorektales Karzinom	BGP-I* (leberabs. *)
5	fetale Leber links	BGP-I*
	adulte Leber rechts	BGP-I*
6	fetale Leber links	CALLA
	adulte Leber rechts	CALLA
7	fetale Gallenblase	AFP
8	adulte Leber	N-PP-III
9	Gallenblasenkarzinom	CEA
10	fetale Gallenblase	BGP-I*
11	hepatozelluläres Leberkarzinom	BGP-I*
12	cholangiozell. Leberkarzinom	BGP-I*
13	cholangiozell. Leberkarzinom	CA-19-9
14	hepatozelluläres Leberkarzinom	N-PP-III
15	Lebermetastase: Mammakarzinom	BGP-I*
16	Leber: Non-Hodkin-Lymphom	BGP-I*
17	Lebermetastase: Bronchialkarzinom	BGP-I*
18	Lebermetastase: Colorektales Karzinom	N-PP-III
19	Fettleber: Grad 1	BGP-I*
20	Leberzirrhose	BGP-I*

Abb. Nr.:	Gewebe: intestinal	Antigen-Darstellung
21	Leber: Extrahepatischer Gallengangsverschluß	BGP-I*
22	Chron. aggressive Hepatitis	BGP-I*
23	Primär biliäre Zirrhose	BGP-I*
24	adultes Colon	BGP-I*/CEA
25	Colitis Ulcerosa	BGP-I*/CEA
26	Dickdarmkarzinom: undiff. (Grad 3)	BGP-I*
27	Dickdarmkarzinom: hochdiff. (Grad 1)	BGP-I*/CEA/NCA
28	Magenkarzinom: Siegelring-Typ	CEA

Abb. Nr.:	Gewebe: extraintestinal	Antigen-Darstellung
29	Dysplastische Bronchialschleimhaut	BGP-I*
30	Bronchialkarzinom: Plattenepithel-Typ	BGP-I*
31	adulte Schilddrüse	BGP-I*/CEA
32	medull. Schilddrüsenkarzinom	BGP-I*/CEA
33	Endometrium: Schwangerschaft	BGP-I*

IV. DISKUSSION:

1. Methodik

2. Ergebnisse

Zu 1. Methodik:

Wesentlich für diese Studie war vor allem, daß nur die hier verwendete IOP-Technik, im Gegensatz zur *FLUORESZENZMIKROSKOPIE*, die zwar gegenüber der erstgenannten Zeitvorteile bietet, und auch von Svenberg verwendet wurde, eine exakte Beurteilung der histologischen Verhältnisse und damit genaue Lokalisation von Antigenen erlaubt.

Es standen auch noch andere immunhistochemische Verfahren, wie z.B. die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (Sternberger et al. 1970) zur Verfügung, denen aber wegen der technisch komplizierteren Durchführbarkeit und teilweise schlechteren Haltbarkeit der eingetretenen Farbreaktion die indirekte Immunperoxidase-Methode vorgezogen wurde.

In der vorliegenden Studie wurde die IOP-Technik mit mono- und polyklonalen Antisera durchgeführt. Es zeigte sich aber bereits in den Vorversuchen, daß die monoklonalen CEA-Antisera stark mit NCA kreuzreagierten und mit den monoklonalen NCA-Antisera eine nur sehr schwach ausgeprägte Anfärbung erzielt werden konnte, so daß auf eine weitere Anwendung dieser Antisera verzichtet werden mußte.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Spezifität der Antisera gewidmet (S. 24ff und Tab. 2, S. 30). Anfängliche Kreuzreaktionen von polyklonalem A-BGP-I und A-CEA mit Granulozyten konnten durch Nachabsorption (Prof. Lamerz) beseitigt werden.

Zusätzlich wurde das BGP-I-Antiserum noch einmal gegen CEA absorbiert, um hier eine Kreuzreaktion zu vermeiden.

In weiterführenden Versuchen zeigte sich, daß zwischen dem nicht gegen Leber absorbierten, dem leberabsorbierten und zusätzlich gegen CEA absorbierten BGP-I-Antiserum sowohl färberisch als auch in bezug auf die histologische Reaktion kein Unterschied festgestellt werden konnte.

Die exakte Austestung der Antiserumverdünnungen war eine entscheidende Voraussetzung für das Zustandekommen bestmöglicher Anfärbungen, ohne dabei eine unspezifische Hintergrundaktivität zu erhalten. Dazu trug auch eine genügend lange Vorinkubation mit dem unspezifischen Antiserum bei.

Um exakte und im gesamten Versuchsablauf vergleichbare Färbeergebnisse zu erzielen, liefen bei jeder Versuchsreihe Vergleichsstandarts für die entsprechenden Antiseren mit. Somit konnten versuchsablaufbedingte Schwankungen in der Farbreaktion erkannt und diese Serien von der Bewertung ausgeschlossen werden.

In den Vorversuchen zeigte sich auch, daß bei einigen Antiseren wie z.B. N-PP-III und CALLA erst durch eine Vorbehandlung mit Pronase bzw. Pepsin eine Farbreaktion an formalinfixierten Präparaten erzielt wurde, oder diese wesentlich verstärkt werden konnte.

Zu 2. Ergebnisse:

2.1 BGP-I-Antiserum

Für die vorliegende Studie war die Frage nach der Spezifität und möglichen Kreuzreaktivität von BGP-I von großer Bedeutung. Durch zahlreiche Absorptionen und die anschließende immunologische Überprüfung sowie vor allem immunhistochemische Spezifitätsuntersuchungen an ausgewählten Organen konnte eine Kreuzreaktion von BGP-I mit CEA und NCA auf ein zu vernachlässigendes Minimum reduziert werden.

2.2 BGP-I-Leberspezifität

Bereits zu Beginn der Untersuchungen ließ sich die von Svenberg und Mitarbeiter (1976-79) für BGP-I beschriebene Leberspezifität nicht aufrecht erhalten. Die Lebermetastasen colorektaler Karzinome stellten sich nämlich ebenfalls BGP-I-positiv dar (Abb. 4). In Übereinstimmung mit o.g. Autor fand sich das BGP-I in den Gallenkapillaren (Kanalikuli), nicht jedoch in den größeren intrahepatischen Gallengängen und abführenden Gallenwegen. Nur die fetale Gallenblase zeigte, im Gegensatz zur adulten, eine schwache BGP-I-Anfärbung (Abb. 10).

Durch weiterführende Versuche konnte auch ein Vorkommen außerhalb des Verdauungstraktes gefunden werden. So wurde BGP-I z.B. in den Endometrialdrüsen von Schwangeren und im Plattenepithelkarzinom der Lunge nachgewiesen (Abb. 30 und Abb. 33).

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß es sich bei BGP-I weder um ein leberspezifisches noch organspezifisches Antigen handelt.

2.3 BGP-I und seine wichtigsten kreuzreagierenden Antigene, CEA und NCA

Auf Grund der biochemischen Gemeinsamkeiten von BGP-I mit CEA und NCA, die in wenigen identischen Antigenloci begründet ist (s. Schema 1, S.), die für mögliche Kreuzreaktionen dieser Antigene verantwortlich sein können, wurden CEA und NCA im Verlauf der gesamten Studie für eine histologische Abgrenzung zu BGP-I mituntersucht. Um eben hierbei mögliche Kreuzreaktionen zu vermeiden, wurden nur hochgereinigte und anschließend immunologisch, sowie vor allem immunhistologisch überprüfte CEA- + NCA-Antisera für diese Studie verwendet.

Bereits der biochemische, physikalische und immunologische Vergleich von BGP-I mit CEA und NCA zeigt, daß es sich bei BGP-I um ein zwar mit o.g. Antigenen kreuzreagierendes, aber dennoch eigenständiges Antigen handelt.

Dies wird auch insbesondere durch sein von CEA und NCA differentes histologisches Auftreten belegt. So wurden bei dieser Untersuchung CEA und NCA nie in der Leber, in Endometrialdrüsen von Schwangeren oder dysplastischer Bronchialschleimhaut, BGP-I und CEA nicht in Milz, Lunge und Pankreas, und BGP-I schließlich, im Gegensatz zu CEA, nicht im Kolloid der Schilddrüse, in dukталen Strukturen der Mamma oder in einem Gallenblasenkarzinom nachgewiesen (siehe Tab. 4 und 5).

Im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde CEA von Thung und Mitarbeiter (1979) bei 30% und von Roncalli und Mitarbeiter (1985) in bis zu 80% hepatozellulärer Leberkarzinome in den Gallenkapillaren nachgewiesen. Roncalli fand CEA zusätzlich zytoplasmatisch und in den Gallenkapillaren der normalen und dysplastisch veränderten Leber des Erwachsenen.

Beide Autoren verwendeten wie in dieser Arbeit formalinfixierte und anschließend in Paraffin eingebettete Präparate. Einige Leberpräparate von Roncalli stammten von Autopsien. Alle Präparate waren von mehreren Pathologen histologisch überprüft worden.

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurde abweichend von der hier eingesetzten IOP-Technik die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (Sternberger et al. 1970) verwendet.

Thung setzte ein gegen A/B-, 0-Erythrozyten und Human-Normalserum absorbiertes CEA ein. Angaben über die entsprechende Verdünnung lagen nicht vor.

Das CEA von Roncalli wurde 1:100 verdünnt und Spezifitätskriterien nach Mukai und Rosai (1980) angegeben. Auf Grund dieser Angaben der o.g. Untersucher, und weil hier nur hochgereinigtes und immunologisch, sowie vor allem immunhistologisch überprüfbares CEA-Antiserum verwendet wurde, mit dem nie eine Anfärbung in der Leber erzielt werden konnte, können wir nur vermuten, daß die Beobachtungen von Thung und Roncalli einer Kreuzreaktion ihrer CEA-Präparationen mit BGP-I zugeschrieben werden muß.

2.4 Abhängigkeit der BGP-I-Expression von der Zelldifferenzierung.

In der normalen Erwachsenenleber war im Gegensatz zum hepatozellulären und cholangiozellulären Leberkarzinom kein BGP-I nachweisbar. Interessant war auch die Feststellung, daß das BGP-I nur beim cholangiozellulären Leberkarzinom in den Drüsenepithelien vorkommt.

Beim hepatozellulären Leberkarzinom hing die BGP-I Verteilung von der Zelldifferenzierung ab. Undifferenziertere Karzinome (Abb. 11) zeigten eine noch zusätzliche, zytoplasmatische Anordnung, während das BGP-I in hochdifferenzierten Karzinomzellen (Abb. 11) ausschließlich im Membranbereich lokalisiert war.

Der normale Dickdarm (Abb. 24) zeigte eine nur schwach ausgeprägte, vorwiegend luminal, das Dickdarmkarzinom hingegen eine auffallend starke wiederum luminal gelegene Anfärbung für BGP-I. Hierbei war ebenfalls der Differenzierungsgrad für die BGP-I-Lokalisation von Bedeutung. Bei undifferenzierten Dickdarmkarzinomen (Abb. 26) trat das BGP-I noch wie CEA, und weniger NCA, stark zytoplasmatisch, mit einer zusätzlichen luminalen Verteilung auf, während BGP-I bei hochdifferenzierten Karzinomen (Abb. 27) fast ausschließlich luminal zur Darstellung kam, CEA, und weniger NCA, vorwiegend zytoplasmatisch blieben.

Von den untersuchten Plattenepithelkarzinomen waren nur Bronchialkarzinome in der Lage, BGP-I zu exprimieren. In der Lebermetastase eines Adenokarzinoms der Lunge und bereits in atypischer Plattenepithelmetaplasie der Bronchialschleimhaut konnte BGP-I nachgewiesen werden (Abb. 17 und Abb. 29). Der Primärtumor dieses Adenokarzinoms war BGP-I-negativ. Diese Beobachtung kann aber nicht als sicher angesehen werden, da es sich hierbei um Autopsiematerial handelte, dessen autolytische Veränderungen zu diesem Ergebnis geführt haben mögen.

Das normale Bronchialsystem war allerdings für BGP-I, CEA und NCA negativ.

2.5 BGP-I bei Cholestase

Als cholestatische Erkrankungen wurden besonders Fälle von primär biliären Zirrhosen in verschiedenen Verlaufsstadien immunhistochemisch überprüft, wobei das Bilirubin zumeist im Normbereich lag (Stieber 1986). Dabei zeigte sich mit fortschreitenden histologischen Veränderungen eine zunehmende intrakanalikuläre BGP-I-Aktivität (Abb. 23). Die y-GT lag beispielsweise in einem fortgeschrittenen Stadium bei 216 U/L (Norm: 4-28 U/L).

Zu einer auffallend deutlichen kanalikulären BGP-I-Anfärbung kam es in Fällen von extrahepatischer Galleabflußstörung (Abb. 21), wie z.B. bei einem Steinverschluß. Dies ist durchaus verständlich, da das BGP-I vorwiegend über die Galle ausgeschieden wird (Svenberg et al. 1981, Stieber 1986), und bei cholestatischen Lebererkrankungen somit zwangsläufig ansteigt.

Bei verschiedenen Lebermetastasen, die entweder selbst für BGP-I positiv waren oder aber nicht anfärbten, kam es nur in den Gallenkapillaren des angrenzenden Leberparenchyms zu einer deutlichen, intrakanalikulär gelegenen BGP-I Darstellung. Als eine mögliche Erklärung hierfür ließe sich eine lokale Cholestase vermuten.

Aber auch bei nicht malignen Leberparenchymschädigungen wie der Hämochromatose (Bilirubin und y-GT im Normbereich) und der Fettleber Grad 1 (Abb. 19, Bilirubin und y-GT im Normbereich) kam es zu einer deutlichen kanalikulären BGP-I-Anfärbung.

Für diese mehrdeutigen Ergebnisse, bei denen die mituntersuchten Cholestaseparameter - soweit bekannt (Stieber 1986) - zum Teil wenig aussagekräftig waren, konnte keine hinreichende Erklärung gefunden werden.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse stellte sich das BGP-I als ein für Cholestase nicht spezifischer, aber bei nachweisbarer Cholestase immunhistochemisch konstant auftretender Parameter dar. Wenn nämlich Bilirubin oder γ -GT im Serum erhöht waren, ergab sich stets eine kanalikuläre BGP-I-Anfärbung. Umgekehrt konnte BGP-I auch bei nicht erhöhten Bilirubins serumwerten, wie das bei den primär biliären Zirrhosen zumeist der Fall gewesen war, frühzeitig immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Kontrollierte Verlaufsuntersuchungen zum Vergleich cholestatischer Laborparameter und dem immunhistochemischen BGP-I-Nachweis wurden allerdings nicht durchgeführt, so daß sich über eine mögliche Korrelation im Einzelfall nichts aussagen läßt.

Insgesamt konnte für das intrakanalikuläre Auftreten von BGP-I bei den verschiedensten Lebermetastasen und auch bei einer Reihe anderer Leberparenchymschädigungen, wie z.B. der Fettleber, keine hinreichende Erklärung für einen möglichen Pathomechanismus gefunden werden.

2.6 Intrakanalikuläres Auftreten von CALLA

Von Interesse für diese Studie war das von Grogan und Mitarbeiter (1985) immunhistochemisch nachgewiesene Vorkommen von CALLA in den Gallenkapillaren der Leber von Erwachsenen (6 Fälle). Bei den untersuchten Leberpräparaten handelte es sich um Biopsien.

Sowohl mit dem A-CALLA der Herstellerfirma Coulter Cloné als auch mit dem von Grogan et al. verwendeten Antikörper der Firma Becton Dickinson konnte zwar in allen Fällen eine positive Reaktion in den Leberzellen gefunden werden, doch war diese diffus zytoplasmatisch und nicht, wie von o.g. Autor beschrieben, kanalikulär. Dies war sowohl bei der adulten als auch der fetalen Leber der Fall (Abb. 6).

Um auszuschließen, daß die hier gemachten Ergebnisse konzentrationsabhängig waren, wurden alle Verdünnungsstufen, von unverdünnt bis 1:250, an fetalen und adulten Lebern ausgetestet.

Möglicherweise erkannte das von Grogan und Mitarbeitern verwendete A-CALLA von unserem abweichende antigene Strukturen, so daß deren Nachweis für die zu uns differente Beobachtung verantwortlich sein konnte. Dies ist vor allem auch deshalb zu vermuten, da anzunehmen ist, daß das monoklonale A-CALLA von Grogan einer anderen Charge entstammte.

Auf Grund der hier gemachten Untersuchungsergebnisse blieb BGP-I das einzige aller untersuchten Antigene, das in den Gallenkapillaren der Leber nachgewiesen werden konnte.

2.7 N-PP-III

Da das N-PP-III bei Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen und akuten Hepatitiden im Serum regelmäßig erhöht war (Stieber 1986) und somit bezüglich der klinischen Daten deutliche Ähnlichkeit mit BGP-I zeigte, wurde das Prokollagen-III in der vorliegenden Studie ebenfalls mituntersucht.

Hier ist jedoch ein direkter Vergleich schon deshalb nicht möglich, weil Prokollagen-III im Gegensatz zu BGP-I von Fibroblasten gebildet wird. Allerdings ähnelt die biliäre Ausscheidung der von BGP-I (Stieber 1986).

In der Lebermetastase eines colorektalen Karzinoms sowie auch im übrigen Leberparenchym, kam es zu einer deutlichen N-PP-III-Vermehrung (vgl. Abb. 8 mit Abb. 18), offenbar als Ausdruck der desmoplastischen Bindegewebsreaktion (Hatahara et al. 1984). Dementsprechend war bei einem szirrösen Magenkarzinom eine besonders ausgeprägte Prokollagen-III-Vermehrung festzustellen.

2.8 AFP / CA-19-19

Wegen des konstanten Auftretens von AFP bei hepatozellulären Leberkarzinomen wurde dieses klassische onkofetale Antigen zur immunhistologischen Abgrenzung von BGP-I ebenfalls mituntersucht.

Wie das AFP in der fetalen Leber zytoplasmatisch, so war BGP-I hierbei kanalikulär nachweisbar, fehlte in der normalen Erwachsenenleber, und konnte wieder bei Leberkarzinomen, ähnlich wie AFP immunhistochemisch dargestellt werden. Somit zeigte das Verhalten von BGP-I die Züge eines onkofetalen Antigens (Alexander et al. 1972, Nap et al. 1986). Die Eigenschaft von BGP-I, nämlich in der unmittelbaren Umgebung der verschiedensten Lebermetastasen exprimiert zu werden, konnte bei AFP nicht festgestellt werden.

Wegen des überaus häufigen Auftretens von CA-19-19 bei cholangiozellulären Leberkarzinomen (Abb. 13) wurde auch dieses Antigen untersucht. Dabei kam es in den Drüsenepithelien des Karzinoms zu einer kräftigen Anfärbung. Dagegen war CA-19-9, im Gegensatz zu BGP-I, in hepatozellulären Karzinomen stets negativ.

Auch für CA-19-9 konnte, wie bei allen anderen untersuchten Antigenen, mit Ausnahme von BGP-I, kein Nachweis in den Gallenkapillaren erbracht werden.

V. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Durch die vorliegende Studie konnte gezeigt werden, daß es sich bei BGP-I weder um ein wie von Svenberg und Mitarbeiter (1976-79-81) beschriebens leberspezifisches, noch um ein rein intestinales Antigen handelt.

In der Leber ist BGP-I bei Expression in den Gallenkapillaren lokalisiert. Intrazytoplasmatisch war es in normaler Leber nie nachweisbar.

Das gegen Leber und zusätzlich gegen CEA absorbierte A-BGP-I erbrachte mit Ausnahme bei der adulten Leber, die gleichen immunhistochemischen Färbeargebnisse wie nicht gegen Leber absorbiertes A-BGP-I.

Bei primären Leberkarzinomen zeigt BGP-I die Züge eines onkofetalen Antigens.

Das Fehlen von BGP-I in undifferenzierten Zellen und sein Auftreten bei zunehmender Zelldifferenzierung in fetalen Organen und Tumorzellen entspricht dem Typ eines sogenannten Differenzierungsantigens.

Für das konstante intrakanalikuläre Wiederauftreten von BGP-I bei cholestatischen, sowie einigen nicht malignen und nicht entzündlichen Lebererkrankungen, ließ sich keine hinreichende Erklärung eines möglichen Pathomechanismus finden. Auf Grund der vorliegenden Befunde kann BGP-I als konstanter Cholestaseparameter, allerdings ohne Spezifität, angesehen werden.

Besonders bei der primär biliären Zirrhose läßt sich BGP-I frühzeitig immunhistochemisch, bei normalen Bilirubinserumwerten, nachweisen.

Der Syntheseort von BGP-I bleibt weiterhin unbekannt.

Neben dem physikalisch-biochemischen Vergleich und dem differenten immunologischen Verhalten weist vor allem das unterschiedliche immunhistochemische Verteilungsmuster BGP-I als ein gegenüber CEA und NCA eigenständiges Antigen aus.

Ein für CEA (Thung et al. 1979, Roncalli et al. 1985) und CALLA (Grogan et al. 1985) beschriebenes, kanalikuläres Vorkommen konnte durch diese Untersuchung nicht bestätigt werden.

Vielmehr blieb BGP-I das einzige aller in dieser Studie untersuchter Antigene, das in den Kanalikuli (Gallenkapillaren) der Leber nachgewiesen werden konnte.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden immunhistochemischen Arbeit wurde das Vorkommen von BGP-I mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Technik untersucht.

Diese Methode erlaubt gegenüber der von Svenberg und Mitarbeiter (1976) verwendeten Immunfluoreszenzmikroskopie eine genaue histologische Beurteilung der Gewebe und damit eine exakte Lokalisation des Antigens.

Zusätzlich wurden CEA und NCA, die wichtigsten mit BGP-I kreuzreagierenden Antigene im Verlauf der gesamten Studie mituntersucht. Insbesondere durch die immunhistologische Abgrenzung, wie auch die Verwendung gut absorbierter und immunologisch überprüfter, spezifischer Antisera und dem biochemisch-physikalischen Vergleich dieser drei kreuzreagierenden Antigene, gelang es, BGP-I als zwar kreuzreagierendes, aber dennoch eigenständiges Antigen auszuweisen.

Da BGP-I als leberspezifisch beschrieben worden war (Svenberg et al. 1976-79), wurden noch andere speziell bei der Leber bedeutsame Antigene wie AFP, N-PP-III, CALLA und CA-19-9, ebenfalls zur immunhistologischen Abgrenzung mituntersucht.

In Übereinstimmung mit Svenberg fand sich BGP-I in den Gallenkapillaren der Leber, nicht jedoch in den größeren intrahepatischen und abführenden Gallenwegen, sowie der Gallenblase des Erwachsenen. Lediglich das fetale Gallenblasenepithel stellte sich schwach zytoplasmatisch BGP-I-positiv dar.

BGP-I ist aber nicht, wie früher beschrieben (Svenberg et al. 1976-79), ausschließlich auf die Leber beschränkt, sondern tritt auch besonders stark in colorektalen Karzinomen auf. Außerdem läßt es sich bereits in atypischer, metaplastischer Bronchialschleimhaut, im Plattenepithelkarzinom sowie Adenokarzinom (Lebermetastase) der Lunge und Endometrialdrüsen bei Gravidität nachweisen.

Besonders in Karzinomen ergab sich eine positive Korrelation des BGP-I Auftretens und seiner intrakanalikulären Lokalisation mit der Zelldifferenzierung. Bei hepatozellulären Karzinomen fand sich BGP-I bei geringer Zelldifferenzierung vorwiegend zytoplasmatisch verteilt, bei höherer Differenzierung fast ausschließlich membranständig. In undifferenzierten Dickdarmkarzinomen war BGP-I zytoplasmatisch und luminal, in hochdifferenzierten Karzinomen vorwiegend luminal lokalisiert.

Das Vorkommen von BGP-I in der fetalen Leber, mit Fehlen in der normalen Erwachsenenleber und erneuter Expression bei primären Leberkarzinomen, zeigt die Züge eines onkofetalen Antigens.

Da BGP-I im wesentlichen über die Galle ausgeschieden wird, ist sein kanalikulärer Nachweis bei cholestatischen Lebererkrankungen erklärlich. So z.B. besonders deutlich bei einem extrahepatischen Gallengangverschluss, aber auch bei der primär biliären Zirrhose. Ob eine lediglich in der Umgebung von Lebermetastasen nachzuweisende BGP-I-Expression einer lokal begrenzten Cholestase zugeschrieben werden kann, bleibt offen.

Für das kanalikuläre Auftreten von BGP-I bei akuten und chronischen Hepatitiden, der Fettleber und der Hämochromatose, auch ohne Zirrhosebildung (Bilirubinwerte jeweils zumeist in der Norm), konnte keine schlüssige pathogenetische Vorstellung entwickelt werden.

Ein für CEA (Thung et al. 1979, Roncalli et al. 1985) und CALLA (Grogan et al. 1985) beschriebenes intrakanalikuläres Vorkommen konnte durch die vorliegende Studie nicht bestätigt werden, so daß BGP-I das einzige aller hier untersuchten Antigene blieb, für das eine Lokalisation in den Gallenkapillaren der Leber nachgewiesen werden konnte.

VII. LITERATURVERZEICHNIS:

- Abelev, G.I., Perova, S.D., Khramkova, N.I., Postnikova, Z.A., Irlin, I.S.: Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplant. Bull.* 1, 1974 (1963)
- Abelev, G.I., Assercritova, I.V., Kraevsky, N.A., Perova, S.D., Perevodchikova, N.I.: Embryonal serum alpha-globulin in cancer patients: diagnostic value. *Int. J. Cancer* 2, 551 (1967)
- Abelev, G.I.: Alpha-fetoprotein production by normal liver and liver tumors. In: Peeters, H. (ed.), *Protides of biological fluids*, vol. 18. p. 203. Oxford: Pergamon Press 1971
- Abelev, G.I.: Regulation of alpha-fetoprotein synthesis. *Neoplasma (Bratisl.)* 20, 563 (1973)
- Adinolfi, A., Adinolfi, M., Cohen, S.: Isolation and characterization of human foetal alpha-globulin (aIF) from foetal and hepatoma sera. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 251, 197 (1971)
- Ahnen, D.J., MD, Nakane, P.K., PHD, Borwn, W.R.: Ultrastructural Localization of Carcinoembryonic Antigen in Normal Intestine and Colon Cancer, Abnormal Distribution of CEA on the Surfaces of Colon Cancer Cells, *Cancer* 49: 2077-2090, 1982
- Ahrends, J.W., Bosman, F.T., Hilgers, J.: Tissue Antigens in Large-Bowel Carcinoma, *Biochemica and Biophysica Acta* 780 (1985), 1:19, Elsevier
- Alexander, P.: Foetal "antigens" in cancer. *Nature (Lond.)* 235, 137 (1972)
- Alpert, E., Schur, P., Drysdale, J., Isselbacher, K.: Human alpha-fetoprotein: purification and physical properties. *Fed. Proc.* 30, 246 (1971-a)
- Alpert, E., Pinn, V.W., Isselbacher, K.H.: Alpha fetoprotein in a patient with gastric carcinoma metastatic to the liver. *New Engl. J. Med.* 285, 1058 (1971-b)
- Anderson, K.C., Bates, M.P., Slaughenhaupt, B.L., Pinkus, G.S., Schlossman, S.F., Nadler, L.M.: Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: A model of human B cell differentiation, *Blood* 63:1424, 1984
- Atkinson, B.F., Ernst, C.S., Herlyn, M., Steplewski, Z., Sears, H.F., Koprowski, H.: Gastrointestinal cancer associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res.* 1982 Nov. 42 (11): 4820-4832
- Avrameas, S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6:43, 1969-a
- Avrameas, S.: Indirect immunoenzyme techniques for the intracellular detection of antigens. *Immunochemistry* 6:825-831, 1969-b
- Bettelheim, P., Pajetta, E., Majdic, O., Gardner, H., Schwärzmeier, J., Knapp, W.: Expression of a myeloid marker on TdT-positive acute lymphocytic cells: Evidence by double fluorescence staining, *Blood* 60:1392, 1982
- Biempica, I., Morecki, R., Wu, G.H., Giambrone, M.A., Rojkind, M.: Immunochemical localization of type B collagen. A component of basement membrane in human liver. *Amer. J. Pathol.* 98 (1980) 591-602
- Bien, Le T.W., Boue, D.R., Bradley, G., Kersey, J.: Antibody affinity may influence antigenic modulation of the common acute lymphoblastic leukemia antigen in vitro, *J. Immunol* 129:2287, 1982

- Björnkland, V., Bjoernklund, B., Wittekind, C., Kleist, von S.: Immunohistochemical localisation of the tissue polypeptide antigen (TPA) and carcino-embryonic antigen (CEA) in breast cancer. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect A* 90:471, 1982
- Bordes, M., Knobel, S., Martin, F.: Cancinoembryonic antigen (CEA) and related antigens in blood cells and hematopoietic tissues. *Eur. J. Cancer*, 11: 783-786, 1975.
- Braun, M.P., Martin, P.J., Ledbetter, J.A., Hansen, J.A.: Granulocytes and cultured human fibroblasts express common acute lymphoblastic leukemia-associated antigens, *Blood* 61:718, 1983
- O'Brien, M.J., Zamcheck, N., Burke, B., Kirkham, S.E., Saravis, C.A., Gottlieb, L.S.: Immunocytochemical localization of carcinoembryonic antigen in benign and malignant colorectal tissues. *Am J Clin Pathol* 1981: 75:283-290
- Brümmendorf, T. u. Mitarb.: Carcinoembryonales Antigen: Diagnose und Tumorprogression bei gastrointestinalen Tumoren. *Dtsch. med. Wschr.* 110 (1985) 1963-1968
- Burtin, P., Sabine M.C., Chavanel, G.: Presence of carcinoembryonic antigen in children's colonic mucosa. *Int. J. Cancer* 10:72-76, 1972-a
- Burtin, P., Martin, F., Sabine, M.C., Kleist, von S.: Immunological study of polyps of the colon. *J. Natl Cancer Inst* 48:25, 1972-b
- Burtin, P., Chavanel, G., Hirsch-Marie, H.: Characterization of a second normal antigen that cross-reacts with CEA. *J. Immunol*, 1973-a:111:1926-1928
- Burtin, P., Kleist, von S., Sabine, M.C., King, M.: 1973-b. Immunohistological localization of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting antigen in gastro-intestinal normal and tumoral tissues. *Cancer Res.* 33:3299.
- Burtin, P., Membrane antigen of the colonic tumours, *Cancer* 34 suppl.: 829-34 Sep. 74
- Burtin, P., Quan, P.C., Sabine, M.C.: Nonspecific cross-reacting antigen as a marker of human polymorphs, macrophages and monocytes. *Nature (Lond.)*, 255, 714-716 (1975)
- Burtin, P., The carcinoembryonic antigen of the digestive system CEA and cross-reacting antigens. In: Faber E. ed. *Pathophysiology of Carcinogenesis in Digestive Organs*. Baltimore: University Park Press, 1977-a:259-267
- Burtin, P., Sabine, M.C., Chavanel, G.: A comparative study of the localization of CEA and NCA in cancerous and normal gastrointestinal tissues. *Int. J Cancer* 1977-b, 19:634-641
- Burtin, P.: The carcinoembryonic antigen of the digestive system (CEA) and the antigens cross-reacting with it. *Ann Immunol* 1978: 129 C:185-198
- Burtin, P., Calmettes, C., Fondaneche, M.C.: CEA and non-specific cross-reacting antigen (NCA) in medullary carcinomas of the thyroid *Int J. Cancer* 1979: 23:741-745
- Burtin P., Flandrin, G., Fondaneche, M.C.: Presence of NCA (non-specific cross-reacting antigen) in the cells of the human granulocyte series. *Blood Cells* 1980, 6:263-273
- Burtin, P., Chavanel, G., Hendrick, J.C., Frenoy, N.: Antigenic variants of the nonspecific cross-reacting antigen (NCA), I. *Immunol.* 3, 839-845, 1986
- Carrel, S. Schmidt-Kessen, A., March, J.P., Heumann, D., Girardet, C.: Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) on human malignant melanoma cell lines. *J. Immunol* 130:2456, 1983
- Chessels, J.M., Harcisty, R.M., Rapson, N.T., Greaves, M.F.: Acute lymphoblastic leukaemia in children: Classification and prognosis, *Lancet* 2:130, 1977

- Clark, J.V.: Assessment of foetal and cord blood, amniotic fluid and hepatoma patients blood for three foetal antigens. *Prot. biol. Fluids* 18. 235 (1971)
- Clavell, L.A., Lipton, J.M., Blast, R.C., Kudish, M., Pesando, J., Schlossman, S.F., Rity, J.: Absence of common ALL antigen on normal bipotent myeloid, erythroid and granulocytic progenitors, *Blood* 58: 333-336, 1981
- Colombo, M., Annoni, G., Donato, M., Martines, D., Zaramella, M., Bianchi, P., Pierno, A., Tiribelli, C.: Serum type III procollagen peptide in alcoholic liver disease and idiopathic hemochromatosis: its relationship to hepatic fibrosis, activity of the disease and iron overload. *Hepatology* 5(3):475, 1985
- Cossmann, J., Neckers, L.M., Leonard, W.J., Greene, W.C.: Polymorphonuclear neutrophils express the common acute lymphoblastic leukemia antigen. *J Exp Med* 1983; 157:1064-9
- Darcy, D.A., Turberville, C., James, R.: Immunological study of carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein. *Br J Cancer* 1973; 28:147-160
- Durie BGM, Grogan, T.M.: CALLA-positive myeloma: An aggressive subtype with poor survival. *Blood* 66:229, 1985
- Dyce, B.J., Haverback, B.J.: (1974) Free and bound carcinoembryonic antigen in neoplasms and in normal adult and fetal tissue. *Immunochemistry* 11:423-430
- Engelhardt, N.V., Goussev, A.I., Shipova, L.Ja., Abelev, G.I.: Immunofluorescent study of alpha-fetoprotein (alpha fp) in liver and liver tumours. I. Technique of alpha fp localization in tissue sections. *Int. J. Cancer* 7, 198 (1971)
- Fessler, J.H. & Fessler, L.I.: (1978) Biosynthesis of procollagen. *Ann Rev Biochem* 47, 129-162
- Fletcher, R.H.: Carcinoembryonic antigen. *Ann. intern. Med.* 104 (1986) 66-73
- Fleuren, G.J., Nap, M.: Different immunohistological patterns of CEA in primary and metastatic ovarian adenocarcinomas, in Second European Conference on Clinical Oncology and Cancer Nursing, Amsterdam, Nov 2-5, 1983, pp 31
- Foon, K.A., Tood, R.F., III Immunologic Classification of Leukemia and Lymphoma, *Journal Blood*, Vol 68, No 1, July 1986
- Frei, A., Zimmermann, A., Weigand, K.: The N-terminal propeptide of collagen type III in serum reflects activity and degree of fibrosis in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 4(5):830, 1984
- Gadler, H., Bremme, K., Wahren, B.: Distribution of tumor-associated antigen CEA and crossreacting NCA in fetal organs. *Int. J. Cancer* 1980, 25, 91-94
- Galambos, M.R., Collins, D.C. and Galambos J.T.: A radioimmunoassay procedure for type III procollagen: its use in the detection of hepatic fibrosis. *Hepatology* 5(1):38 1985
- Ganrot, P.O., Trell, E.: Alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma with an abnormal electrophoretic alpha-fraction. *Acta med. scand.* 188, 303 (1970)
- Gay, S., Fietzek, P.P., Remberger, K., Eder, M., Kuhn, K.: Liver cirrhosis: Immunofluorescence and biochemical studies demonstrate two types of collagen. *Klin Wochenschr* 1975; 53:205-208
- Gay, S., Gay, R.E.: Pathobiochemistry of connective tissue in breast cancer. *Vorh. Dtsch. Ges. Path.* 69, 62-73, 1985
- Gitlin, D., Perricelli, A., Gitlin, G.: Synthesis of alpha-fetoprotein by liver, yolk sac and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res.* 32, 979 (1972)
- Gold, P., Freedman, S.O.: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp Med* 1965-a: 121:439-459

- Gold, P., Freedman, S.O.: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965-b; 122:467-481
- Gold, D., Gold, M., Freedman, S.O.: Cellular location of carcino- embryonic antigens of the human digestive system. *Cancer Res* 1968: 23:1331-1334
- Gold, P., Krupey, J., Ansari, H.: Position of CEA of the human digestive system in ultrastructure of tumor cell surface. *J. Natl Cancer Inst* 45:219, 1970
- Goldenberg, D.M., Pavia, R.A., Hansen, H.J. et al: Synthesis of carcinoembryonic antigen in vitro. *Nature [New Biol]* 239:189-190, 1972
- Goldenberg, D.M. Sharkey, R.M., Primus, F.J.: Immunocytochemical detection of carcinoembryonic antigen in conventional histopathology specimens. *Cancer (phila.)*, 42: 1546-1553, 1978
- Goussev, A.I.: Engelhardt, N.V., Masseyeff, R., Camain, R., Basteris, B.: Immunofluorescent study of alpha-fetoprotein (alpha fp) in liver and liver tumours. II. Localization of alpha fp in the tissues of patients with primary liver cancer (PLC). *Int. J. Cancer* 7, 207 (1971)
- Graham, R.C., Lundholm, U., Karnovsky, M.J.: Cutochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *J Histochem Cytochem* 13:150, 1965
- Greaves, M.F., Brown, G., Rapson, N.T., Lister, T.A.: Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol immunopathol*, 4:67, 1975
- Greaves, M. Biological basis of differential prognosis in immunologically defined sub-classes of acute lymphoblastic leukemia. In: *Leukemia Markers*, ed. W. Knapp, Academic Press, p. 463-466, 1981-a
- Greaves, M.F.: Monoclonal antibodies as probes for leukemic heterogeneity and hemopoetic differentiation. In: *Leukemia Markers*, ed. W. Knapp, Academic Press. p. 19-22, 1981-b
- Greaves, M.F., Hariri, G., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Ritter, M.A., Ritz, J.: Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* 61:628 (1983)
- Grogan, T.M., Verdi, C., The expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen by Bile Canaliculi, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 312, No. 15, 993 (1985)
- Grunert, F., Abuharfeil, N., Schwarz, K., Kleist, von S.: 1985, Two CEA and three NCA species, although distinguishable by monoclonal antibodies, have nearly identical peptide patterns. *Int. J. Cancer* 36:357
- Haggarty, A., Legler, L., Krantz, M.J., Fuks, A.: Epitopes of carcino- embryonic antigen defined by monoclonal antibodies prepared from mice immunized with purified carcinoembryonic antigen or HCT-8R cells. *Cancer Res.*, 46: 300-309, 1986
- Hahn, E.G., Martini, G.A., Clinical parameters of fibroplasia, *Ital. J. Gastroenterol.* (1980-a), 12, 41-46
- Hahn, E.G., Martini, G.A., Diagnostische Parameter der Kollagenbiosynthese, *Internist* 21, 195-201 (1980-b)
- Hahn, E.G., Ott, U., Martini, G.A., Die Leberfibrose, Sonderdruck aus *Z. Gastroenterologie* 18 (1980-c) 453-469 und 507-523
- Hamada, Y, MD, Yamamura, M., MD, Hioki, K., MD, Yamamoto, M., MD, Nagura, H., MD, Watanabe, K., MD: Immunohistochemical Study of Carcino- embryonic Antigen in Patients with Colorectal Cancer: Correlation with plasma carcinoembryonic antigen levels, *Cancer* 55: 136-141, 1985
- Hammarström, S., Engvall, E., Sundblad, G. (1976) CEA: Purification, structure and antigenic properties. *Health Control in Detection of Cancer. Skandia International Symposia* (ed. by H. Bostrom, T. Larsson and N. Ljungstedt), p. 24, Almqvist and Wiksell, Stockholm

- Hammarström, S., Troye, M., Wahlund, G., Svenberg, T., Perlmann, P. (1977) K cell mediated lysis of cultured colon carcinoma and urinary bladder carcinoma cells induced by monospecific antisera against carcino-embryonic antigen (CEA) and two CEA-related normal glycoproteins, *Int. J. Cancer*, 19, 756
- Hammarström, S., Svenberg, T., Hedin, A., Sundblad, G. (1978) Antigens related to CEA. Chemistry of tumour-associated antigens. *Scand J. Immunol. Suppl.* 6
- Hatahara, T., Igarashi, S., Funaki, N., High concentrations of N-terminal peptide of type III procollagen in the sera of patients with various cancers, with special reference to liver cancer. *GANN* 75(2):130 (1984)
- Heald, J., Buckley, C.H., Fox, H.: An immunohistochemical study of distribution of carcinoembryonic antigen in epithelial tumors of the ovary. I. *Clin Pathol.* 1979, 32 (9), 918-926
- Heyderman, E., Neville, A.M.: A short immunoperoxidase technique for the demonstration of carcinoembryonic antigen and other cell products. *J. Clin Pathol* 30:138, 1977
- Hooghe, R.: Benign hepatomas and oral contraceptives. *Lancet* 1974 I, 630
- Huitric, E.: An ultrastructural study of the localization of the carcinoembryonic antigen in adenocarcinomas of the human colon. *Ann Immunol (Paris)* 124 c:603, 1973
- Huitric, E., M.Sc., Laumonier, R., M.D., Burtin, P., M.D., Kleist, von S., M.D., Chavanel, G.: An Optical and Ultrastructural Study of the Localization of Carcinoembryonic Antigen (CEA) in Normal and Cancerous Human Rectocolonic Mucosa, Laboratory Investigation, Vol. 34, No. 1, p. 97, 1976
- Kessler, M.J., Shively, J.E., Pritchard, D.G., Todd, C.W., Isolation, immunological characterization, and structural studies of a tumor antigen related to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.*, 38, 1041-1048 (1978)
- Khoo, S.K., Warner, N.L., Lie, J.T., Mackay, I.R.: (1973-a), Carcino-embryonic antigenic activity of tissue extracts: a quantitative study of malignant and benign neoplasms, cirrhotic liver, normal adult and fetal organs. *Int. J. Cancer* 11:681-687
- Khoo, S.K., Mackay, I.R., 1973-b carcinoembryonic antigen in serum in disease of liver and pancreatic tissues, *Clin. Path.* 26, 470
- Klapdor, R., Greten, H.: Das tumorassoziierte Antigen CA 19-9 in der Differentialdiagnostik und Verlaufskontrolle von Malignomen des Pankreas und Magen-Darm-Traktes. *Dtsch.med. Wschr.* 109 (1984) 1935-1939
- Klapdor, R.: Neue tumorassoziierte Antigene fuer die Diagnostik und die Verlaufskontrolle solider Tumoren. *Schweiz. Rundschau Med. (Praxis)* 74 (1985) 1289-1390
- Kleist, von S., Burtin, P.: Isolation of a fetal antigen from human colonic tumors, *Cancer Res* 29:1961, 1969
- Kleist, von S., Chavanel G., Burtin, P.: Identification of an antigen from normal human tissue that cross-reacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:2492-2494
- Kleist, von S., Troupel, S., King, M., Burtin, P.: 1977. The NCA (nonspecific cross-reacting antigen) in patient's sera: a clinical evaluation in comparison to CEA. *Br. J. Cancer* 35:875
- Kleist, von S.: Antigens cross-reacting with CEA evolution of their interrelationship and clinical role. In: *Carcino-embryonic Proteins*, Vol. 1, FG Lehmann (ed.), Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1979 pp 35-39
- Kleist, von S., Wittekind, C., Sandritter W.: CEA-Gewebspositivitaet in Mammakarzinomen in Bezug auf den histologischen Typ und die CEA-Serumpositivitaet. CEA carcinoembryonales Antigen und andere Tumormarker. *Tumor Diagnostik Verlag* 1980: 144-147

- Koelma, I., M.D., Nap, M., M.D. Ph.D., Huitema, S., Krom, R., M.D., Ph.D., Houthoff, H., M.D. Ph.D., Hepatocellular Carcinoma, Adenoma, and Focal Nodular Hyperplasia, Arch. Pathol. Lab. Med 1986, 110:1035-1040
- Kojiro, M., Kawano, U., Isomura, T. et al: Distribution of albumin and/or AFP-positive cells in hepatocellular carcinoma. Lab Invest 1981; 44:221-226
- Konomi, H., Sano, J., Nagai, Y., Immunohistochemical localization of type I, III and IV (basement membrane) collagens in the liver, Acta Pathol. Jpn.31:973, (1981)
- Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D., Furler, P.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. Somatic Cell Genet 1979 Nov 5(6): 957-971
- Krupey, J., Gold, P., Freedman, S.O., Purification and characterization of carcinoembryonic antigens of the human digestive system. Nature, 215: 67-68, 1967.
- Krupey, J. Gold, P., Freedman, S.O.: Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J. Exp. Med. 1968: 128:387
- Kuhajda, F.P., Offutt, L.E., Mendelsohn, G.: The distribution of carcinoembryonic antigen in breast carcinoma. Cancer, 1983, 52, 1257-1264
- Kuo, T., Rosai, J. Tillack, T.W.: Immunological studies of membrane glycoproteins, isolated from human breast carcinomas. Int. J. Cancer 1973; 12:532-542
- Kuroki, M., Koga, Y., Matsuoka, Y.: Purification and characterization of carcinoembryonic antigen-related antigens in normal adult feces. Cancer Res., 41: 713-720, 1981.
- Lindemann: Zur Chemie des Carbazols, Ber. Deutsch Chem. Gesell. 57, 555, 1924
- Lamerz, R., Fateh/Moghadam, A., Carcinofoetale Antigene, Klin. Wschr. 53, 147-169, Springer-Verlag 1975-a
- Lamerz, R., Grunst, J., Fateh/Moghadam, A., Schmalhorst, U., Eisenburg, J., Pichlmaier, H.: Serum-Alpha-Fetoprotein-Veränderungen nach partieller Hepatektomie am Menschen, Klin. Wschr. 53, 129 (1975-b)
- Lamerz, R., Die karzinofoetalen Antigene, Aerztliche Praxis, XXIX. Jahrgang Nr. 20 (Seiten 953-957) vom 8. März 1977
- Lehmann, F.G.: Epidemiologie und Diagnostik des primären Leberzellcarcinoms. Internist (Berl.) 14, 274 (1973-a)
- Lehmann, F.G., Lehmann, D., Martini, G.A.: Alpha 1-Fetoprotein bei Lebererkrankungen. Z. Gastroent. 11, 385 (1973-b)
- Lehmann, F.G., Lehmann, D.: Alpha 1-Fetoprotein in malignen Tumoren. Klin. Wschr. 52, 222-232 (1974)
- Loprinzi, C., L., u. Mitarb.: Prospective evaluation of CEA levels and alternating chemotherapeutic regimens in metastatic breast cancer. J. Clin. Oncology 4 (1986) 46-56.
- Lurie, B.B., Loewenstein, M.S., Zamcheck, N.: Elevated carcinoembryonic antigen levels and biliary tract obstruction. J. Amer. med. Ass., 233, 326-330 (1975)
- Mach, J.P., Pusztaszeri, G.: Carcinoembryonic antigen (CEA): Demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. Immunochemistry 1972: 9:1031-1034
- Magnani, J.L., Steplewski, Z., Koprowski, H., Ginsburg, V.: Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients with a mucin. Cancer Res 1983 Nov; 43 (11) 5489-5492

- Magnani, J.L.: Carbohydrate differentiation and cancer-associated antigen detected by monoclonal antibodies. *Biochem Soc Trans* 1984 Jun; 12(3): 543-5
- Masopust, J., Kithier, K., Rdl, J., Koutecky, J., Kotal, L.: Occurrence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases. *Int. J. Cancer* 3, 364 (1968)
- Meister, P., Huhn, D., Nathrath, W., Malignant histiocytosis Virchows Arch. A., Path. Anat. Histol. 385, 233-246/1980 and Nathrath W., Immunohistochemical characterization of histiocytic tumours *Diag. Histopathol.* 4, 79-87/1981
- Melia W., Johnson, P.J., Carter, S., et al: Plasma CEA in the diagnosis and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1981; 48: 1004-1008
- Metzgar, R.S., Borowitz, M.J., Jones, N.H., Dowell, B.L.: Distribution of common acute lymphoblastic leucemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J. Exp Med* 154:1249-54, 1981
- Morelli, A., Vedovelli, A., Fiorucci, S., Angelini, G., Fini, C., Palmerini, C., and Floridi, A.: Type III procollagen peptide and PZ-peptidase serum levels in pre-cirrhotic liver diseases. *Clin. Chim. Acta* 148 (2):87 1985
- Morson, B.C., Sobin, L.H., Histological typing of intestinal tumours (international Histological Classification of Tumours No. 15) World Health Organisation, Genf 1976
- Mukai, K. and Roasi, J.: Application of immunoperoxidase techniques in surgical pathology. In *Progress in Surgical Pathology*, eds C. Fenoglio and M. Wolff, pp. 15-50 Masson, U.S.A. (1980)
- Murata, Katsumi, Kudo, M., Onuma, F., Motoyama, T., Changes of collagen types at various stages of human liver cirrhosis, *Hepato-Gastroent.* 31(4): 158 (1984)
- MacNab, G.M., Urbanowicz, J.M., Kew, M.C.: CEA in hepatocellular carcinoma, *Br. J. Cancer* 1978, 38:51-54
- Nadler, L.M., Ritz, J., Todd, R.F. III, Griffin, J., Reinherz, E.L., and Schlossman, S.F.: Diagnosis and treatment of human leukemias and lymphomas utilizing monoclonal antibodies, *Progress in Hematology XII*, ed. E. Brown, Grune and Stratton, Inc., N.Y. p. 187-225, 1981
- Nagell, van, J.R., Goldenberg, D.M.: Carcinoembryonic antigen staining of endometrial and endocervical carcinomas. *Lancet*, 1980, 213-15
- Nakane, P.K., Pierce, G.B.: Enzyme labeled antibodies; preparation and application for localization of antigens. I. *Histochem. Cytochem.* 14:929, 1966
- Nakane, P.K.: Recent progress in peroxidase-labeled antibody method. *Ann NY Acad Sci* 1975; 254:203-211
- Nakano, H., Kawasaki, T., Miyanuma, M., Fukuda, Y. and Imura, H. The concentration of amino-terminal peptide of type III procollagen related to age and liver fibrosis. *Kanzo (Acta Hepatol. Jpn.)*, 24, 786-796 (1983) (in Japanese)
- Nap, M., Hoor, K.A., Fleuren, G., Cross-Reactivity with Normal Antigens in Commercial Anti-CEA Sera. Used for Immunohistology. The Need for Tissue Controls and Absorptions, *Amer. J. Clin. Pathol.* 79: 25-31 (1983)
- Nap, M. Fleuren, G.J.: Immunohistochemical demonstration of carcino-embryonic antigen (CEA) in lung cancer, its localization in relation to tumour type and differentiation, in Peeters H (ed): *Protides of the Biological Fluids: Proceedings of the 31st Colloquium, 1983-b*, Elmsford, N.Y., Pergamon Press Inc., 1984-a
- Nap, M., Keuning, H., Burtin, P., Oosterhuis, J.W., Fleuren, G., CEA and NCA in Benign and Malignant Breast Tumors, *I. Clin. Pathol.* 1984-b, 32:526-534

- Nap, M., M.D., Ph. D.: Carcinoembryonic Antigen (CEA), problems and perspectives, Bull. Cancer (Paris), 1986, 73, 3, 325-331
- Nathrath W.B.J., Wilson, P.D., Trejdosiewics, L.K.: Immunohistochemical demonstration of epithelial and urothelial antigens and the light- and electron-microscope levels. Acta Histochem (Suppl) 25:73, 1982
- Neville, A.M. and Laurence, D.J., Report of the workshop on the carcinoembryonic antigens (CEA): the present position and proposals for future investigation. Int. J. Cancer, 14, 1-18 (1974).
- Neville, A.M., Carcino embryonic antigen, the current status. Arch. Pathol. Lab. Med 1981: 105:281-287
- Newman, E.S., Petras, S.E., Hamilton, J.G., Hager, H.J.B., Hansen, H.J. (1972). Demonstration of two tumor-associated antigens in human colonic adenocarcinomas. Fed. Proc., 31
- Nishioka, M., Iwata, T., Okita, K., Harada, T., Fujita, T.: Localisation of alpha-fetoprotein in hepatoma tissues by immunofluorescence. Cancer Res. 32, 162 (1972)
- Nowack, H., Gay, S., Wick, G., Becker, U. and Timpl, R. (1976-a): Preparation and use in immunohistology of antibodies specific for type I and III collagen and procollagen. J. Immunol. Meth., 12, 117-124.
- Nowack, H., Olsen, B.R., Timpl, R. Characterization of the aminoterminal segment in type III procollagen. Eur J. Biochem. 1976-b; 70:205-216
- O'Connor, G.T., Tatarinov, Y.S., Abelev, G.I., Uriel, J.: A collaborative study for the evaluation of a serologic test for primary liver cancer. Cancer (Philad.) 25, 1091 (1970)
- Ohuchi, N., Thor, A., Nose, M., Fujita, J., Kyogoku, M., and Schlom, J., Tumor associated glycoprotein (TAG-72) detected in adenocarcinomas and benign lesions of the stomach. Int. J. Cancer, 38: 1986 (in press).
- Ott, U., Hahn, E., Moshudis, E., Bode, J.C., and Martini, G.A., (1977): Immunohistologischer Nachweis von Typ I und Typ III Kollagen in Leberbiopsien: fruehe und spaete Veraenderungen bei alkoholischer Lebererkrankung. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 83, 537-540.
- Ouchterlony, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progress in Allergy 5: 1 (1958)
- Pierce, G.B.: Differentiation of normal and malignant cells. Fed. Proc. 29, 1248 (1970)
- Popper, H. and Udenfriend, S., (1970): Hepatic Fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigation. Am. J. Med., 49, 707-721.
- Portugal, M.L., Azevedo, M.S., Manso, C.: Serum alpha-fetoprotein and variant alkaline phosphatase in human hepatocellular carcinoma, Int. J. Cancer 6, 383 (1970)
- Primus F.J., Wang R.H., Sharkey, R.M., et al: Detection of carcino- embryonic antigen in tissue sections by immunoperoxidase. J. Immunol Methods 8: 267-276, 1975
- Primus, F.J., Sharkey, R.M., Hansen, H.J., Goldenberg, D.M., Immunoperoxidase detection of carcinoembryonic antigen, An overview, Cancer 1978: 42:1540-1545
- Primus, F.J., Clark, Ch.A., Goldenberg, D.M., Immunoperoxidase localization of carcinoembryonic antigen in normal human intestinal mucosa, Nat. Cancer Inst. 67: 1031 (1981)
- Primus, F.J. Kuhns, W.J., Goldenberg, D.M., Immunological heterogeneity of carcinoembryonic antigen: Immunohistochemical detection of carcino- embryonic antigen determinants in colonic tumors with monoclonal antibodies, Cancer Research 43, 693-701, Februar 1983-a

- Primus, F.J., Newell, K.D., Blue, A., and Goldenberg, D.M. Immunological heterogeneity of carcinoembryonic antigen: antigenic determinants on carcino-embryonic antigen distinguished by monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 43: 686-692, 1983-b
- Prockop, D.J., Kivirikko, K.J., Tuderman, L. et al. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N. Engl. J. Med.* 1979: 301:13-23, 77-85
- Purtilo, D.F., Yunis, E.J.: Localization of alpha-fetoprotein synthesis in human fetuses and hepatomas. *Abst. Fed. Proc.* 30, 634 (1971-a)
- Purtilo, D.T., Yunis, E.J.: Alpha-fetoprotein: its immunofluorescent localization in human fetal liver and hepatoma. *Lab. Invest.* 25, 291 (1971-b)
- Raedsch, R., Stiehl, A., Gmelin, K., Goetz, R., Kommerel, B., Typ III-Prokollagen-Peptid Spiegel im Serum von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen (abstr). *Z. Gastroenterol* 1981:19:530
- Raedsch, R., Stiehl, A., Waldherr, R., Mall, G., Gmelin, K., Goetz, R., Walker S. Czygan, P., Kommerell B., Procollagen-type III-peptide serum concentrations in chronic persistent and chronic active hepatitis and in cirrhosis of the liver and their diagnostic value. *Z. Gastroenterol* 1982:20:738-43
- Raedsch, R., Stiehl, A., Sieg, A., Walker, S., Kommerell, B., Biliary excretion of procollagen type III peptide in Healthy humans and in patients with alcoholic cirrhosis of the liver, *Gastroenterol.* 85(6): 1265 (1983)
- Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H., and Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature* 283:583, 1980
- Ritz, J., Nadler, L.M., Bhan, A.J., Notis-McConarty, J., Pesando, J.M., and Schlossman, S.F., Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. *Blood* 48: 648, 1981.
- Röttinger, E.M.: Tumormarker und Tumornekrosefaktor-Selektivitaet, Spezifitaet und klinische Relevanz, *Muench. med. Wschr.* 128 (1986) Nr. 37, 625-629
- Rogalsky, Y.V., Variations in carcinoembryonic antigen localization in tumors of the colon. *J. Natl Cancer Inst* 54: 1061-1071, 1975
- Rogalsky, V.Y., Specificity, localization and prevalence of carcino- embryonic antigen (CEA). In: Fishman WH, ed. *Onco developmental gene expression*. New York: Academic Press 1976:593-598
- Rogers, G.T., Rawlins, G.A., and Bagshawe, K.D. Somatic-cell hybrids producing antibodies against CEA. *Br. J. Cancer*, 43: 1-4, 1981
- Rohde, H., Vargas, L., Hahn, E., Kalbfleisch, H., Bruguera, M., Timpl, R., Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver disease, *European Journal of Clinical Investigation* (1979) 9, 451-459
- Rohde, H., Bruckner, P., and Timpl, R., Immunochemical properties of the aminopropeptide of procollagen type III, *Eur. J. Biochem.* 135: 197 (1983-a)
- Rohde, H., Langer, I., Krieg, T., Timpl, R., Serum and urine analysis of the aminoterminal procollagen peptide type-III by radioimmunoassay with antibody Fab fragments., *Collagen and Re. Res.* 3(5): 371 (1983-b)
- Roncalli, M., Borzio, M. De Giagi, G., et al: Liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma: A histological and immunohistochemical study. *Histopathology* 1985:9:209-221

- Rojkind, M., Martinez-Palomo, A.: Increase in type I and type III collagens in human alcoholic liver cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:539-543
- Rojkind, M. and Dunn, M.A., (1979-a): Hepatic fibrosis. *Gastroenterology*, 76, 849-863
- Rojkind, M., Giambrone, M.-A., and Biempica, L., (1979-b): Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*, 76, 710-719
- Ruoslahti, E., Seppaelae, M.: Studies of carcino-fetal proteins. III. Development of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein. Demonstration of alpha-fetoprotein in serum of healthy human adults. *Int. J. Cancer* 8. 374 (1971-a)
- Ruoslahti, E., Pihko, B., Seppaelae, M., Vuopio, P.: A comparative study of alpha-fetoprotein from fetuses and patients with hepato-cellular cancer. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 27. Suppl. 116. 57 (1971-b)
- Sandler, R.S. u. Mitarb.: Lost effectiveness of postoperative carcino- embryonic antigen monitoring in colorectal cancer. *Cancer* 53 (1984) 193-198
- Schäfer, H.E., Fischer, R.: Der Peroxydasenachweis an Ausstrichpräparaten sowie an Gewebsschnitten nach Entkalkung und Paraffineinbettung. *Klin Wochenschr* 46: 1228, 1968
- Schüppel, R.: Carcinoembryonic Antigen (CEA), Non-specific crossreacting Antigen (NCA) and Tissue polypeptide Antigen (TPA) bei kolorektalen Karzinomen. Eine immunhistochemische Untersuchung. Inaugural Dissertation, Muenchen 1985
- Seppaelae, M. Ruoslahti, R.: Alpha-fetoprotein in maternal serum: a new marker for detection of fetal distress and intrauterine death. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 115. 48 (1973-a)
- Seppaelae, M.: Increased alpha-fetoprotein in amniotic fluid associated with a congenital esophageal atresia of the fetus. *Obstet. and Gynec.* 42 613 (1973-b)
- Sharkey, R.M., Primus, F.J., Goldenberg, D.M.: Comparison of the sensitivity of the indirect, antibody-conjugated and the triple-bridge immunoperoxidase methods for immunohistochemical detection of carcinoembryonic antigen. *Histochemistry* 1980; 66:35-42
- Shevchuk, M.M., Fenoglio, C.M., Richart, R.M.: Carcinoembryonic antigen localization in benign and malignant transitional epithelium. *Cancer* 1981, 47, 899-905
- Silver, H.K., Deneault, J., Gold, P., Thompson, W.G., Shuster, J., Freedman, S.O.: The detection of alpha 1-fetoprotein in patients with viral hepatitis. *Cancer Res.* 34, 244 (1974)
- Smith, J.A., Francis, T.I., Edington, G.M., Williams, A.O.: Immunofluorescent localisation of human alpha-fetoprotein in fetal and neonatal livers and cultured cells from hepatocellular carcinoma. *Brit J. Cancer* 25, 343 (1971-a)
- Smith, J.B.: Occurrence of alpha-fetoprotein in acute viral hepatitis, *Int. J. Cancer* 8, 421 (1971-b)
- Smith, J.B., Barker, L.F.: Alpha-fetoprotein and liver specific antigen in viral hepatitis type B. *Arch. intern. Med.* 133, 437 (1974)
- Staab, H.J. u. Mitarb.: The clinical validity of circulating tumor- associated antigens CEA and CA 19-9 in primary diagnosis and follow up to patients with gastrointestinal malignancies. *Klin. Wschr.* 63, (1985) 106-115

Sternberger, L.A., Haray, P.H., Cunulis, J.J., Meyer, H.G., 1970: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem* 18:315-333

Stieber, P., Biliaeres Glycoprotein (BGP-I)-Reinigung, Nachweis und klinische Bedeutung. Inaugural Dissertation, Muenchen 1986

Svenberg, T., Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization, *Int. J. Cancer*: 17, 588-596 (1976)

Svenberg, T., Hammarstroem, S., Zeromski, J., Immunofluorescence studies on the occurrence and localization of the CEA-related biliary glycoprotein I (BGP I) in normal human gastrointestinal tissues *Clin. exp. Immunol.* (1979-a) 36, 436-441

Svenberg, T., Hammarstroem, S., and Hedin, A., Purification and properties of biliary glycoprotein I (BGP I). Immunohistochemical relationship to carcinoembryonic antigen, *Molecular Immunology*, Vol. 16, pp. 245-252, Pergamon Press Ltd. (1979-b)

Svenberg, T., Wahren, B., Hammarstroem, S., Elevated serum levels of a biliary glycoprotein (BGP I) in patients with liver or biliary tract disease, *Clin. exp. Immunol.* (1979-c) 36, 317-325

Svenberg, T., Hammarstroem, S., Andersson, G., Johansson, C., Samuelson, K., Wahren, B., Serum Level of biliary glycoprotein I, a determinant of cholestasis, of similar use as gamma- glutamyltranspeptidase, *Sand, J. Gastroent.* 1981, 16, 817-824

Talerman, A., Van der Pompe, W.B., Haise, W.G., Gaggerman, L., Boekestein-Tjahjadi, H.M., (1977): Alpha-Fetoprotein and carcino- embryonic antigen in germ cell neoplasma, *Br. J. Cancer*, 35, 288

Tatarinov, Y.S.: Detection of embryospecific alpha-globulin in the blood sera of patients with primary liver cancer. *Vop. med. Khim.* 10, 90 (1964)

Taubman, M.B., Goldberg, B., and Sherr, C.J. (1974): Radioimmunoassay for human procollagen, *Science*, 186, 1115-1117

Taubman, M.B., Kammerman, S., and Goldberg, B. (1976): Radioimmunoassay of procollagen in serum of patients with Paget's disease of bone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 152, 284-287

Thomas, P., Zamcheck, N., Role of the liver in clearance and excretion of circulating carcinoembryonic antigen (CEA). *Digest. Dis. Sci* Vol. 28, No. 3, 216-224 (1983)

Thung, S.N., Gerber, M.A., Sarno, E., et al: Distribution of five antigens in hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 1979, 41:101-105

Torres-Salinas, M., Pares, A., Caballeria, J., Jimenez, W., Heredia, D., Bruguera, M., Rodes, J.: Serum procollagen type III peptide as a marker of hepatic fibrogenesis in alcoholic hepatitis, *Gastroenterol.* 90(5):part I:1241, 1986

Tsushida, Y., Saito, S., Ishida, M., Ohmi, K., Urano, Y., Endo, Y., Oda, T.: Yolk sac tumor (endodermal sinus tumor) and alpha-fetoprotein: a report of 3 cases. *Cancer (Philad.)* 32, 917 (1973)

Tsutsumi, Y., Nagura, H., Watanabe, K., Immunohistochemical observations of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related substances in normal and neoplastic pancreas, *I. Clin. Pathol* 1984, 82:535-542

Tuberville, C., Darcy, D.A., Laurence, D.Jr., Johnson, E.W., Neville, A.M., Studies on carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein. CCEA-2; Preparation and chemical characterization. *J. Immunochem* (1973), 10:841-843

Uriel, J.: Transitory liver antigens and primary hepatoma in man and rat. *Path. et Biol.* 17, 877 (1969)

Uriel, J.: Transitory liver antigens and primary hepatoma. *Prot. biol. Fluids* 18, 211 (1970)

Uriel, J., Loissillier, F., Szekeley, A.M., Bismuth, H.: Autoradiographic localization of intracellular alpha-fetoprotein in primary liver cancer in man. *Biomed.* 21, 21 (1974)

Vargas, L., Rohde, H., Lemann, F.-G., Hahn, E., Timpl, R., Bode, J.C., and Martini, G.A. (1978): Diagnosis of fibrotic activity in liver disease: long term study of the aminoterminal procollagen type III peptide in serum of patients with hepatitis A and B, chronic active hepatitis and alcoholic liver disease. *Abs. IASL Meeting* 125.

Villano Del, B.C., Zurowski, V.R. Jr.: The carboanhydrate antigenic determinant 19-9 (CA 19-9): a monoclonal antibody defined tumor marker. *Lab Res Methods Biol Med* 1983; 8: 269-82

Wagener, C., Czaszar, H., Totovic, V., Breuer, H. (1978): A highly sensitive method for the demonstration of carcinoembryonic antigen in normal and neoplastic colonic tissue. *Histochemistry* 58:1-11

Wagener, C., Hain, F., Breuer, H., Olude, S., Cremer, H., Mueller-Wallraf, R. (1981-a) Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen in normal transitional and inflamed colonic mucosa. *Oncodev. Biol. Med* 2:331-343

Wagener, C., Wallraf, R.M., Nissen, S., Groner, J., Breuer, H., Localization and concentration of carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal tumors: Correlation with CEA levels in plasma. *J. Natl Cancer Inst.* (1981-b); 67:539-547

Wagener, C., Hain, F., Foedisch, H.-J., Breuer, H., Localisation of carcinoembryonic antigen in embryonic and fetal human tissues, *Histochemistry* (1983) 78:1-9

Wahren, B., Nilsson, B., Zimmermann, R., Urinary CEA for prediction of survival time a recurrence in bladder cancer 1982-a, July 1, 50(1):139

Wahren, B., Gahrton, G., Ruden, U., Hammerstroem, Clinical elevation of NCA in patients with chronic myelocytic leukaemia. *In. J. Cancer* 1982-b Feb. 15, 29 (2): 133-7

Wald, N.J., Brock, D.J., Bonnart, J.: Prenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly by maternal serum alpha-fetoprotein measurement. *Lancet* 1974 I. 765

Weigand, K., Zaugg, P., Frei, A., and Zimmermann, A., Long-term follow-up of serum N-terminal propeptide of collagen type III levels in patients with chronic liver disease, *Hepatology* 4(5):835 (1984)

Zamcheck, N., Doos, W.G., Prudente, R., Lurie, B.B., Gottlieb, L.S., Prognostic factors in colon carcinoma: Correlation of serum carcino-embryonic antigen level and tumor histopathology. *Hum Pathol* 1975: 6:31-45.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof.Dr. B. Wiebecke für die hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. M. Eder für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. R. Lamerz für die Reinigung und Überlassung von Antiseren und für den überaus fruchtbaren Gedankenaustausch, sowie die zur Verfügung gestellte Literatur und die zahlreichen wertvollen Hinweise, die in die vorliegende Studie mit eingeflossen sind.

Herzlicher Dank sei auch an Herrn Prof. Dr. K. Remberger für wertvolle Hinweise gerichtet.

Dank schulde ich auch Herrn Dr. W.B.J. Nathrath für das AFP-Antiserum und die nützlichen Hinweise und Herrn Dr. Ch. Nerl für das CALLA-Antiserum.

Mein Dank sei auch an Frau Permanetter für die zuverlässige Unterstützung im Labor und an Frau K. Rotter für die technische Hilfe beim Erstellen des Manuskriptes gerichtet.

Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Christian Günther REISCHLE
Geburtsdatum:	12. Juli 1960
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Konfession:	Evang.-Luth.
Eltern:	Dr. med. G.H. Reischle und U. Reischle, geb. Wolter
Grundschule:	An der Simmernstraße (München), 06.09.1966 bis 27.07.1970
Gymnasium:	Humanistisch-Neusprachliches und Mathematisch-Naturwissenschaftliches Nymphenburger Gymnasium in München, 10.09.1971 bis 27.06.1980
Abitur:	Am 27.06.1980
Wehrdienst:	7. Gebirgsjägerbataillon 8, 01.07.1980 bis 15.04.1981
Studium der Medizin:	An der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Sommersemester (SS)1981 bis SS 1987: • Ärztliche Vorprüfung 1983 • 1. Ärztliche Prüfung 1984 • 2. Ärztliche Prüfung 1986 • 3. Ärztliche Prüfung 1987
Derzeitiger Arbeitsplatz:	Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Wohnort:	München

